

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik
der Johannes Gutenberg-Universität
(Direktor: Prof. Dr. med. P. Schölmerich)

ISOLIERUNG UND UNTERSUCHUNG
DER H- UND L-KETTEN VON IMMUNGLOBULIN G
VON NORMALPERSONEN BZW. DER L-KETTEN
PLASMOCYTOMKRANKER IN DER
POLYACRYLAMIDGELDISKELEKTROPHORESE MIT
ANWENDUNG DER
ISOELEKTRISCHEN FOKUSSIERUNG

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von
Josef Wolfgang Schmidt
aus Weißkirchlitz

Mainz 1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554427_0072

Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik
der Johannes Gutenberg-Universität.

Isolierung und Untersuchung der H- und L-Ketten von Immun-
globulin G von Normalpersonen bzw. der L-Ketten Plasmocy-
tomkranker in der Polyacrylamidgeldiskelektrophorese mit
Anwendung der isoelektrischen Fokussierung.

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz,
den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

Josef Wolfgang Schmidt
aus Weißkirchlitz



Fachbereichsdekan: Professor Dr. med. J. Fischer

Referent: Professor Dr. med. W. Prellwitz

I. Korreferent: Professor Dr. med. P. Schölmerich

II. Korreferent: Professor Dr. med. W. Opferkuch

Für die Überlassung der Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Prellwitz, Leiter des Zentrallabors der Medizinischen Universitätskliniken in Mainz. Wertvolle Unterstützung erhielt ich von Herrn Dr. med. E. Köttgen, Medizinische Universitätsklinik, Freiburg.

Für technische Assistenz danke ich Frau H. Rose und Frau B. Hem-sath.

Meinem Vater in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Einführung

Struktur der Immunglobuline..... 7
Einteilung der Immunglobuline.....10
Fragestellung der Arbeit.....11

Material und Methoden

A) Gewinnung von immunologisch reinem Ig G.....	12
B) Gewinnung von immunologisch reinen H- und L-Ketten....	13
C) Reinheitsprüfung der gewonnenen Proteine.....	14
D) Diskelektrophoretische Untersuchungen.....	14
a) Allgemeine Technik.....	15
b) "Normale" Diskelektrophorese.....	15
c) Sodiumdodecylsulfat- (SDS)-Diskelektrophorese.....	16
d) Ampholine-Diskelektrophorese.....	18
E) "Trägerfreie" isoelektrische Fokussierung.....	19
F) Immunologische Untersuchung der Gele.....	20

Ergebnisse

ad A) und C) Gewinnung von immunologisch reinem Ig G....	22
ad B) und C) Gewinnung von immunologisch reinen H- und L-Ketten.....	22
ad C) Diskelektrophorese.....	
b) "Normale" Diskelektrophorese.....	22
c) SDS-Diskelektrophorese.....	23
d) Ampholine-Diskelektrophorese.....	25
E) "Trägerfreie" isoelektrische Fokussierung.....	27
F) Immunologische Geluntersuchungen.....	27

Diskussion

I)	Polyacrylamidgeldiskelektrophorese.....	28
II)	SDS-Diskelektrophorese.....	28
III)	Isoelektrische Fokussierung.....	29
IV)	Heterogenität der L-Ketten in der Literatur.....	31
V)	Versuch einer eigenen Deutung der Bandenentstehung von L-Ketten bei den verschiedenen diskelektro- phoretischen Untersuchungen.....	32

Zusammenfassung.....35

Literaturverzeichnis.....36

Die Kenntnisse über die Struktur der Antikörper wurden erst in den letzten Jahren erarbeitet.

Über die Fähigkeit der Antikörper, sich mit verschiedenen Antigenen zu verbinden, existieren mehrere Theorien.

Schon um 1900 versuchte Paul EHRLICH (27) eine erste Erklärung mit seiner bekannten "Seitenkettentheorie". Weitere Denkmodelle stellten BREINL und HAUROWITZ (9) mit der "Instruktionstheorie" und PAULING (72) mit der "Faltungstheorie" vor.

Aufgrund neuerer Erkenntnisse entwarf BURNET (13) 1959 die "Clonal Selection Theory". Burnet nahm dabei an, daß jede immunkompetente Zelle nur einen einzigen, durch seinen chemischen Aufbau klar definierten Antikörper synthetisieren kann. Grundlage der Antikörperbildung seien genuine Stammzellen. Sie werden durch ein adäquates Antigen zur Antikörperproduktion und zur Proliferation, zur Bildung eines Clons gleicher Zellen angeregt. Diese Hypothese - "eine Zelle - ein Immunglobulin" - ist grundsätzlich heute noch gültig.

Antikörper werden nach dem Vorschlag HEREMANS (42) als "Immunglobuline" bezeichnet. Nach der Definition der WHO (10) sind sie Proteine "animalischer" (animalian) Herkunft, die eine bestimmte Antikörperaktivität besitzen oder diesen in der chemischen Struktur verwandt sind.

1939 hatten TISELLIUS und KABAT (98) mit Hilfe der Plasmaproteinelektrophorese den γ -Globulincharakter der Antikörper nachgewiesen. Aber erst 1959 gelang es PORTER (77) und EDELMAN (21) die weitaus größte γ -Globulinfraktion, das Immunglobulin G, in vier Untereinheiten, zwei schwere H (= heavy) - und zwei leichte L (= light) - Proteinketten aufzuspalten. Die Spaltung wurde durch Reduktion von Disulfidbrücken erreicht. Das Molekulargewicht des Gesamtmoleküls wurde mit 150.000, das der H-Ketten mit ca. 50.000 und das der L-Ketten mit ca. 23.000 bestimmt. Bei der Spaltung mit Papain zerfällt das Immunglobulin G (= Ig G) - Molekül in zwei F_{ab} - und ein F_c -Fragment (PORTER, 77), die peptische Spaltung erbringt jeweils zwei F_{ab}' - und F_c' -Fragmente. Die isolierte H-Kette wird durch Papain in ein F_d - und ein F_c -Fragment gespalten. Nach diesen Befunden ergibt sich in Anlehnung an EDELMAN und GALLY (24) folgendes Antikörpermodell für Ig G (Abb. 1).

Elektronenoptische Bilder (101, 102), physikochemische Untersuchun-

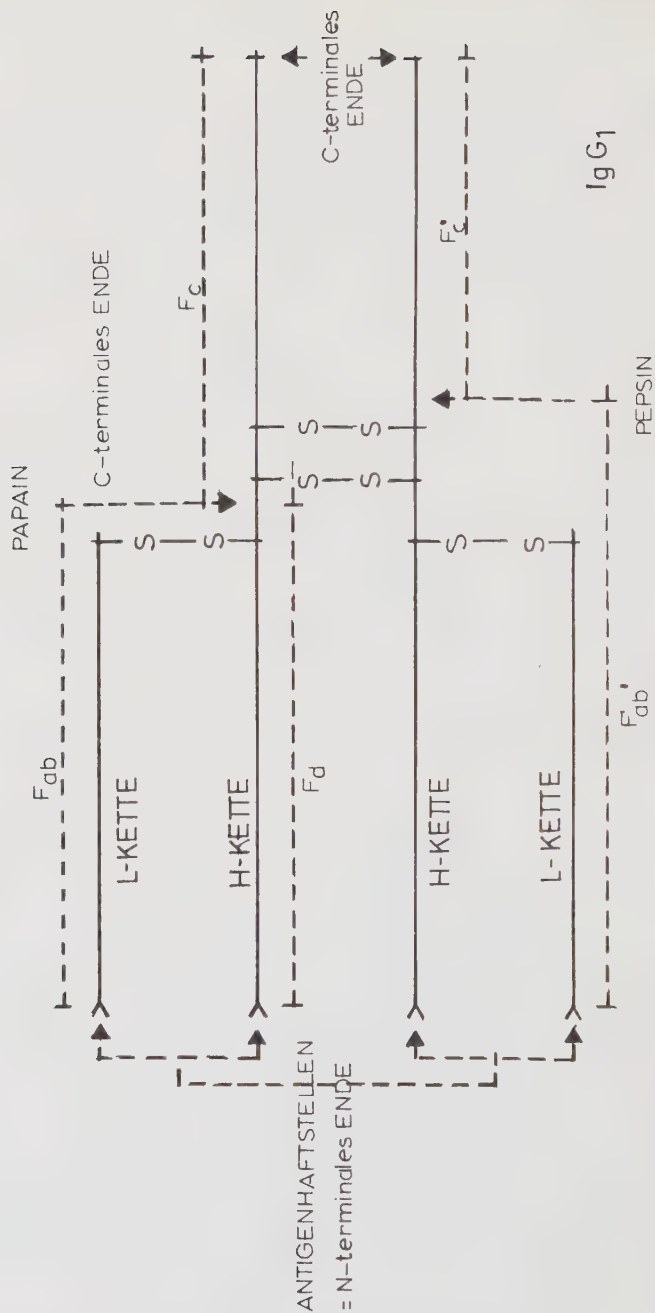


Abb. 1: Antikörpermodell von Ig G modifiziert nach
EDELMANN und GALLY (24)

gen (67) und Röntgenuntersuchungen (96) stimmten damit überein.

Immunologisch lassen sich heute fünf Immunglobuline-Hauptgruppen unterscheiden: Ig G, Ig A, Ig M, Ig D und Ig E.

Die H-Ketten dieser Gruppen sind unterschiedlich, während die L-Ketten bei allen Immunglobulinen identisch sind. Die H-Ketten werden wie folgt bezeichnet: $H\gamma$ (Ig G), $H\alpha$ (Ig A), $H\mu$ (Ig M), $H\delta$ (Ig D) und $H\epsilon$ (Ig E).

Die L-Ketten werden in zwei serologisch verschiedene Formen κ und λ eingeteilt. Jeweils zwei κ - oder λ -Ketten können sich mit H-Ketten eines Typs zu einem Immunglobulinmonomer vereinigen.

Die Immunglobuline einer Klasse (Ig G, A, M, D, E) sind außerordentlich heterogen, da sie sich aus einer Vielzahl spezifischer Antikörper zusammensetzen. Sie unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur und werden von einem Zellclon synthetisiert (13, 38, 63). Bis jetzt war es nicht möglich, größere Mengen monoclonaler Antikörper aus einer Globulinklasse zu isolieren.

Bei der Untersuchung der sogenannten Paraproteine und der Bence-Jones-Proteine (54) bei Patienten mit einem Plasmocytom konnten 1962 EDELMAN und GALLY (23) nachweisen, daß die Bence-Jones-Proteine den Charakter der L-Ketten haben. Die Paraproteine des Serums bei dieser Erkrankung sind keine pathologischen Eiweiße, sondern monoclonale Immunglobuline, die z.T. noch Antikörpereigenschaften haben (28, 57, 89). Das Plasmocytom ist demnach eine maligne Entartung eines Zellclons mit der Fähigkeit der Immunglobulinsynthese.

Mit den Methoden der Aminosäuresequenzanalyse wurden die Primärstrukturen zahlreicher L- und H-Ketten dieser monoclonalen Globuline vollständig aufgeklärt. Diese Untersuchungen wurden zum Teil an den gut züchtbaren Mäuse- und Rattenplasmocytomen durchgeführt.

Zunächst lagen 1965 die Aminosäuresequenz von Bruchstücken (99), 1966 des ersten Bence-Jones-Proteins (100) und 1967 schon von drei Bence-Jones-Proteinen (82) vor.

EDELMAN, CUNNINGHAM, GALL et al. (22) veröffentlichten die erste komplette Analyse eines Ig G Moleküls.

In Deutschland kommen zahlreiche L-Ketten-Sequenzanalysen von HILSCHMANN und seinen Mitarbeitern, vor allem HESS und PONSTINGL (43-46, 49-51, 53, 73-76).

Inzwischen sind dreißig vollständige L-Ketten-Primärstrukturen bekannt. Die untersuchten L-Ketten haben etwa 210 bis 220 Aminosäuren (AS), entsprechend einem Molekulargewicht von rund 23.000.

Bei Strukturvergleichen hat man erkannt, daß die L-Ketten aus zwei etwa gleich großen Teilen aufgebaut sind, einem konstanten und einem variablen.

Der variable Teil, (in dem also von Kette zu Kette verschiedener Herkunft an zahlreichen AS-Positionen AS-Austausche vorliegen) reicht von Position 1 bis ungefähr zur Position 108.

(Die Nummerierung der L-Ketten richtet sich nach der zuerst analysierten λ -Kette Sh (109), bzw. κ -Kette Ag (83), beginnend am N-terminalen Ende).

Die κ - und λ -Ketten unterscheiden sich im konstanten Teil in ca. 65 Positionen. Im variablen Teil kann man bei beiden Gruppen zusätzlich Untergruppen unterscheiden. Diese Untergruppen gleichen sich im variablen (v)-Teil an mehreren Positionen und weisen Variationen der Aminosäuresequenzen in den "Zwischenstücken" auf. Nach der WHO-Nomenklatur (12) werden die κ -Ketten in drei, die λ -Ketten in fünf Untergruppen eingeteilt.

Aus der Primärstruktur der L-Ketten ergibt sich, daß jeweils 60 AS durch eine intramolekulare S-S-Brücke zusammengeschlossen sind. So gleichen sich konstanter und variabler Teil der Kette also formal durch die Zahl der AS und die Brückenbildung. Es entstand die Vorstellung, daß L-Ketten aus einer Urkette durch Duplikation entstanden sind (47, 48).

H-Ketten haben eine Länge von ca. 440 AS und ein MG von ca. 50.000. Insgesamt kann die H-Kette in eine variable und drei konstante Regionen eingeteilt werden, die jeweils ein Viertel der Gesamtkette ausmachen (22). Auch hier findet sich wieder die intramolekulare S-S Schleifenbildung, die 60 AS umfaßt.

Während im variablen Teil der H-Ketten (jeweils in Kombination mit dem v-Teil der L-Ketten) die Antikörperspezifität verankert ist, so ist der konstante c-Teil für Aufgaben wie Komplementbindung, Plazentartartransfer u.ä. (92) verantwortlich.

Nach EDELMAN, CUNNINGHAM und GALL (22) ergibt sich das Schema der Abb. 2.

JgG₁ MODELL

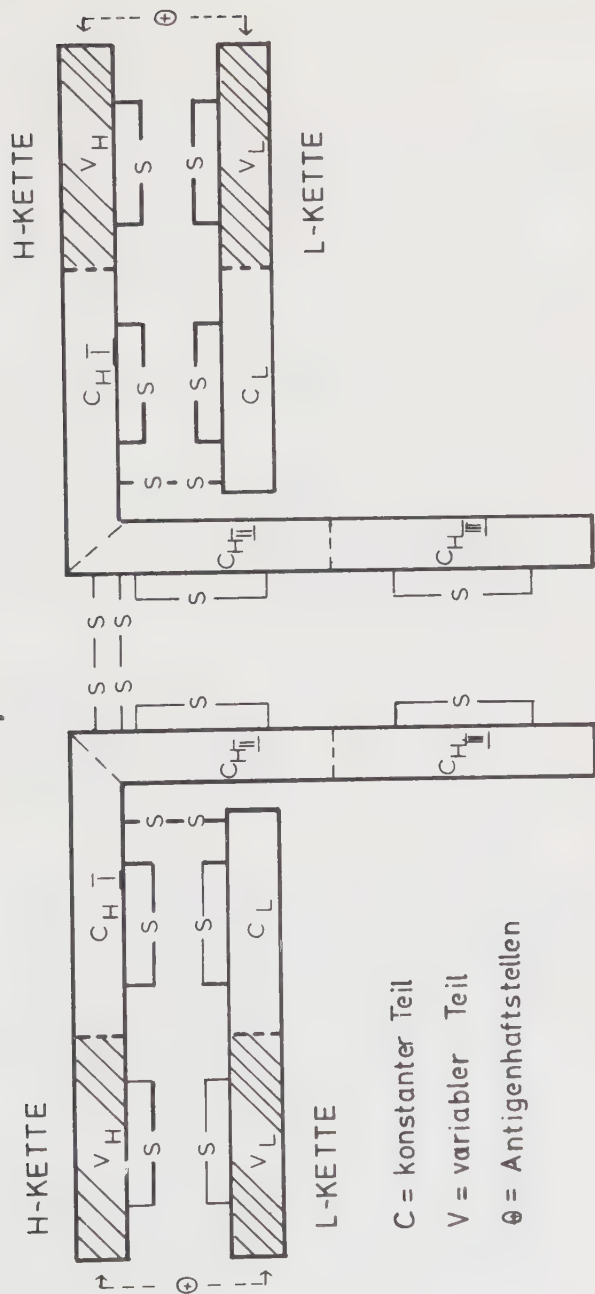


Abb. 2: Erweitertes Antikörpermodell von Ig G₁ modifiziert
nach EDELMAN, CUNNINGHAM, GALL et al. (22).

Heute sind für Immunglobuline folgende Einteilungsmöglichkeiten gebräuchlich:

- a) nach ihrer Klassenzugehörigkeit
 - isotypische Varianten -
- b) nach klar definierten Variationen in der AS-Zusammensetzung, die sich aus allen angelegten Genen mit dominantem Erbgang ergibt
 - allotypische Varianten -
- c) nach den Variationen der Primärstruktur
 - idiotypische Varianten -

ad a) Charakteristisch für die isotypischen Varianten ist, daß sie alle bei einem Individuum ausgeprägt sind. Die Unterteilung der H-Ketten in fünf Hauptgruppen ist bereits angeführt. Weitere Untersuchungen zeigten, daß die γ -Ketten in vier Untergruppen ($\gamma_1 - \gamma_4$) einzuteilen sind (40): Bei Ig A sind die Untergruppen α_1 und α_2 (39, 58, 59), bei Ig M μ_1 und μ_2 (35, 106) bekannt.

Bei den L-Ketten sind nur bei der Hauptgruppe der λ -Ketten isotypische Varianten bekannt, nicht jedoch in der κ -Gruppe. Während sich bei den H-Ketten-Untergruppen die AS-Zusammensetzung in sehr vielen Punkten unterscheidet, treten bei den λ -Ketten sehr spezielle Untergruppen auf, die sich durch Variation einer einzigen AS-Position auszeichnen.

Das Oz-Merkmal bezieht sich auf Position 190 (Lysin an dieser Stelle bedeutet Oz +, Arginin Oz -; 1). Entsprechendes gilt für den Kern-Faktor (Serin-Glycin-Austausch in Position 154; 43).

ad b) Aufgrund der für die allotypischen Varianten dominanten Genstruktur findet man bei einem Individuum von zwei oder mehr möglichen Varianten nur eine phänotypisch ausgeprägt. Bei den H-Ketten sind solche AS-Variationen an mindestens 25 klar definierten Kettenpositionen bekannt. Diese Variationen werden Gm-Faktoren genannt (65, 66) und fortlaufend nummeriert (11).

Bei den L-Ketten ist nur eine allotypische Variante beschrieben; es handelt sich um den bekannten Inv-Faktor der κ -Ketten

(7, 52), wobei an Position 191 Leucin (Inv a) oder Valin (Inv b) stehen kann.

Iso- und allotypische Varianten beziehen sich auf die c-Teile der H- und L-Ketten.

ad c) Die idiotypischen Varianten ergeben sich aus der großen Vielfalt der AS-Zusammensetzung im variablen Teil der H- und L-Ketten. Aus eben dieser großen Zahl von Primärstrukturen resultiert das weite Spektrum der Antikörper mit ihrer scheinbar unbegrenzten Fähigkeit mit Antigenen spezifische Bindungen einzugehen.

Die beschriebene Heterogenität der H- und L-Ketten spiegelt sich naturgemäß auch in ihrem elektrochemischen Verhalten.

Zur Untersuchung dieser Eigenschaften am Beispiel des Immunglobulin G wurden zunächst H- und L-Ketten von Normalpersonen isoliert.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich vor allem mit Untersuchungen der Heterogenität der L-Ketten von Normalpersonen und Patienten mit Plasmocytom.

Methodisch wurde besonders die Polyacrylamid-Diskelektrophorese eingesetzt. Benutzt wurden dabei die

- 1) "normale" Diskelektrophorese
- 2) SDS - "
- 3) Ampholine- "

Die Anwendbarkeit dieser Methoden zur Bestimmung der Molekulargewichte von L- und H-Ketten und der Bestimmung ihrer isoelektrischen Punkte (IEP) wird an Hand von parallel untersuchten Referenzproteinen geprüft. Die Methode der Ampholine-Diskelektrophorese wird für L-Ketten mit der "trägerfreien" isoelektrischen Fokussierung im Saccharosegradienten verglichen.

Material und Methoden

A) Gewinnung von immunologisch reinem Ig G

1) Geräte

Chromatographierrohre, nach eigenen Angaben gefertigt in verschiedenen Größen (s.u.) mit Normschliff am Zulauf und Auslauffritte mit Glassinterfilter Porosität 2

Fraktionensammler LKB-Ultrarac 7000 mit Drop-counter von LKB-Producter, Bromma, Schweden durch Colora Meßtechnik, Frankfurt

Zeiss-Photometer M 4 Q III/ PMQ II von Carl Zeiss GmbH

Knicksches Labor-pH-Meter mit Einstabmeßkette (Fa. Knick, Berlin)

Visking Dialysierschläuche verschiedener Größen (Union Carbidge Corporation, Chicago USA)

2) Reagenzien

Sephadex-Ionenaustauscher und Sephadex-Dextrangele von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

Mercaptoäthanol, Jodacetamid und Polyäthylenglykol Typ 40.000 von Fa. Servas in Heidelberg

alle übrigen Reagenzien von Fa. Merck AG, Darmstadt

Antisera von Behring Werke AG Marburg und Hyland Abt. Travenol Laboratories Inc, Los Angeles, USA.

3) Serum von Normalpersonen S. und Sch., sowie gepooltes Serum von Normalpersonen. (Normalpersonen: klinisch, papierelektrophoretisch und immunologisch kein Anhalt für Immunglobulinstoffwechselstörung).

(Poolserum = Sammelserum mehrerer Personen).

4) Methode

Nach eigenen Erfahrungen erwies sich die hier modifizierte Methode nach JOUSTRA und LUNDGREN (55) zur Ig G Gewinnung als technisch einfach und ertragreich.

Die Chromatographiersäulen wurden generell bei Raumtemperatur von ca. 20°C. im senkrechten Betrieb mit hydrostatischem Druck gefahren. Das Zubereiten der Ionenaustauscher und Gele und das

Gießen der Säulen erfolgte nach Herstellerangaben.

Eiweißgehalte von Lösungen wurden nach den Angaben von WARBURG und CHRISTIAN (107) modifiziert nach KALCKAR (56) bestimmt. Am Spektralphotometer wird die Probeⁿextinktion bei 260 und 280 nm gegen den jeweiligen Puffer als Leerwert abgelesen. Der Eiweißgehalt (Ew-Gehalt) der Lösung ist dann

$$\text{Ext.280} \times 1,45 - \text{Ext.260} \times 0,75 = \text{Ew-Gehalt in mg/ml}$$

5) Arbeitsgang

Zentrifugation der Proben bei 8.000 U/min für 30 min zur Klärung. Auftragen von 60 ml Probe mit 7,5% Eiweißgehalt auf eine Säule (40 x 3 cm) mit Sephadex G 25 medium. Elutionspuffer: Äthylendiaminacetat, pH 7,0; Ionenstärke I = 0,13.

Gesammelt werden alle Fraktionen mit mehr als 1 g% Eiweißgehalt. Das gesammelte Eluat hat eine Eiweißkonzentration von ca. 4,0 g%. 100 ml hiervon werden auf eine Säule (60 cm x 5 cm) mit QAE-Sephadex aufgetragen und mit o.a. Puffer eluiert.

Das eingipflige Eluat enthält ausschließlich IgG mit einer Konzentration von 0,25 g% in 200 ml Gesamtmenge (siehe Ergebnisse, Abb. 3).

Einengen des Eluats in Dialysierschläuchen mit Polyäthylenglykol auf ca. 1/15 der Ausgangsmenge.

B) Gewinnung von H- und L-Ketten

Je 200 mg des in konzentrierter Lösung vorliegenden Ig G werden nach dem Verfahren von FLEISCHMAN, PAIN und PORTER (34) gespalten.

Dabei wird das Substrat mit 0,3 ml Mercaptoäthanol versetzt und während einer Stunde bei Raumtemperatur alle 10 min geschüttelt. Dann wird das Gemisch zu einer Lösung von 0,8 m Jodacetamid in 5 ml einer 0,5 m Trispufferlösung pH 8,0 ins Eisbad gegeben und ebenso geschüttelt.

Anschließend erfolgte dreimalige Dialyse für je 40 min gegen je 2 l 0,9%ige NaCl-Lösung, danach Dialyse über Nacht gegen 7%ige Essigsäure. Das Dialysat wird sodann auf eine Säule (120 cm x 45 cm) mit Sephadex G 100 aufgetragen und mit 7%iger Essigsäure eluiert.

Im Eluat erscheinen zwei deutlich voneinander getrennte Gipfel. Der I. besteht aus reinen H-Ketten, der zweite aus reinen L-Ketten. Gesammelt enthält der I. 120 mg Eiweiß in ca. 250 ml Lösung, der II.

50 mg Eiweiß in ca. 160 ml Lösung. (Schaubild siehe Ergebnisse, Abb. 5). Die beiden Fraktionen werden getrennt ausgiebig gegen Aqua dest. dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Die L-Ketten der Myelomproteine Ba., Be., Lö. und Mo. wurden nach einer früher von PRELLWITZ, HAMMAR al. (79) beschriebenen Methode gewonnen, die ebenfalls immunologisch reine Proteine erbringt. Sie lagen tiefgefroren in wäßriger Lösung vor und wurden vor Gebrauch mit Polyäthylenglykol auf folgende Eiweißkonzentrationen eingeengt:

Ba. 0,03g% Be. 0,04g% Lö. 0,02g% Mo. 0,15g%.

C) Die Reinheit des gewonnenen Ig G bzw. der H- und L-Ketten wird nach der von SCHEIDEGGER (90) beschriebenen Mikromethode untersucht.

D) Diskelektrophoretische Untersuchungen

1) Geräte

Diskelektrophoresekammer der Fa. Wiss.Techn.Werkstätten, Weilheim, Typ DEA 90

Spannungsgeber: Vokam SAE 2761, Shandon Scientif. Comp., London
Gelröhrchen von 8,5 bzw. 14 cm Länge und 0,7 cm innerem sowie 0,9 cm äußerem Durchmesser aus Glas

Mikropipetten verschiedener Größen, Fa. Eppendorf, Hamburg

2) Reagenzien

Ampholine verschiedener pH-Bereiche von LKB-Producter (s.o.).
Bromphenolblau, Amidoschwarz 10 B, Äthanolamin, Äthanol, Essigsäure, Schwefelsäure, Dithiothreitol und Harnstoff, Fa. Merck, Darmstadt, alle übrigen Chemikalien: Fa. Servas Heidelberg.
Zum Ansetzen der Lösungen: Ampuwa (Aqua dest.), Fa. Fresenius, Bad Homburg v. d. H.

Für die Diskelektrophorese ist für alle Chemikalien die höchste Reinheitsstufe zu fordern, um Artefakte zu vermeiden.

3) Proben

Ig G, H- und L-Ketten aus eigener Herstellung, lyophilisiert;
Plasmocytomproteine (s.o.) in konzentrierter wäßriger Lösung;
Referenzproteine der Fa.Boehringer, Mannheim in Substanz; (Aldo-

lase, Albumin, Chymotrypsinogen, Cytochrom C, Katalase und Ovalbumin).

4) Methoden

a) Allgemeine Technik der Kammervorbereitung und Gelzubereitung

Aus apparativen Gründen wurden bei allen Läufen nur 12 Gele eingesetzt.

Zum Gießen der Gele wurden die Gelröhrchen lotrecht in Plastilinmasse gedrückt, so daß der Boden gut verschlossen war.

Nach Einfüllen der Gellösung wurde diese mit Aqua dest. überschichtet, um bei der Polymerisation eine glatte Oberfläche zu erhalten.

Es wurde immer die chemische Polymerisation gewählt. Beim Beschicken der Trennkammer ist darauf zu achten, daß sich an den unteren Gelenden keine Luftblasen befinden, die den Kontakt zu der Elektrodenlösung in der unteren Trennkammer (Unterpuffer) stören. Nach Einfüllung der Elektrodenlösung der oberen Kammer (Oberpuffer), wurde die aufzutragende Probe in der Regel mit Mikropipetten unterschichtet.

Nach dem Lauf wurden die Gele mit Hilfe einer Injektionsspritze mit dünner Kanüle und Aqua dest. aus den Röhrchen gelöst.

Harnstofflösungen wurden immer vor Gebrauch über einen Mischbettonenaustauscher deionisiert.

b) "Normale" Diskelektrophorese

- Gelzubereitung

In Anlehnung an REISFELD und SMALL (87) wurde folgende Gelzubereitung für die Untersuchung von H- und L-Ketten gewählt:

Lösung I: Acrylamid	30,0 g
N,N'-Methylenbisacrylamid (kurz:Bis)	1,0 g
8 m Harnstoff (kurz: Urea)	ad 100,0 ml
Lösung II: Tris (hydroxymethylaminomethan) als Base	18,15 g
1 n HCl	24,00 ml
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (Temed)	0,24 ml
8 m Urea	ad 100,00 ml
Lösung III: Ammoniumperoxodisulfat (kurz: Per)	0,14 g
8 m Urea	ad 100,00 ml

Gellösung: 1 Teil Lösung I + 1 Teil Lösung II + 2 Teile Lösung III

Gelkonzentration (an Acrylamid und Bisacrylamid): 7,5 g%

Oberpuffer Tris	5,16 g	Unterpuffer: Tris	14,5 g
pH 8,91 Glycin	3,48 g	pH 8,07 1 n HCl	60,0 ml
8 m Urea ad	700,00 ml	Aq.d.ad.	1.000,0 ml

- Probenzubereitung

Die Myelom-L-Ketten wurden vor dem Auftragen ausgiebig gegen den Oberpuffer dialysiert, die normalen L-Ketten in einer Konzentration von 0,3g% im Oberpuffer gelöst.

Aufgetragen wurden pro Gel 0,25 mg Protein. Das erforderliche Probenvolumen wurde 1:1 mit Glycerin versetzt und mit 5 μ l 0,05%iger Bromphenolblaulösung gemischt.

- Lauf

Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke durchgeführt. Die Anode lag in der unteren Kammer.

Vorlauf: 30 min bei 2 mA/Gel. Probenauftrag; 30 min Lauf bei 2 mA/Gel (zum langsamen Einwandern der Proben), dann 4 h Lauf bei 5 mA/Gel. Nach 75 % der Laufzeit hat die Bromphenolblau markierung das Gel durchwandert.

Gefärbt wurde mit 1%igem Amidoschwarz 10 B (64) in 7%iger Essigsäure für 30 min. Entfärben durch Schütteln für zwei bis drei Tage in 7%iger Essigsäure.

c) Sodiumdodecylsulfat-(SDS)-Diskelektrophorese

Die SDS-Diskelektrophorese wurde auf Grundlage der Arbeit von SHAPIRO, VINUELA und MAIZEL (91) mit der von WEBER und OSBORN (108) detailliert angegebenen Methode durchgeführt. Bis auf einen Kontrolllauf wurde jedoch statt Aqua dest. für die Lösungen 8 m Urea benutzt.

- Gelzubereitung

Gelpuffer:		Acrylamidlösung:	
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	7,8 g	Acrylamid	22,2 g
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	38,6 g	Bis	0,6 g
SDS	2,0 g	Urea	ad 100,0 ml
Urea	ad 100,0 ml		

Um unlösliche Rückstände zu entfernen, wird die Acrylamidlösung gefiltert und bei 4°C in einer dunklen Flasche aufbewahrt.

Gellösung für 12 Gele in 2,5 cm langer Gelröhrchen (ca. 3 ml/Gel):

- 32 ml Gelpuffer werden entlüftet und mit 18 ml Acrylamidlösung gemischt. Das Gemisch wird entlüftet.
- Zugabe von 1,8 ml frisch bereiteter Perlösung (15 mg Per/ml Urea) und 0,05 ml Temed.
- Sofortiges Füllen der Gelröhrchen

Gelkonzentration: 7,1 g%

Ober- und Unterpuffer (Elektrodenpufferlösung):

Die Pufferlösung ist für die obere und untere Kammer Gelpuffer, der 1:1 mit 8 mUrea verdünnt wird.

- Probenzubereitung

H- und L-Ketten und die Referenzproteine wurden in einer Konzentration von 0,2 - 2,0 mg/ml in folgendem Puffer gelöst und für zwei Stunden bei 37°C gegen Puffer 1 inkubiert:

0,01 m NaPO_4 -Puffer, pH 7,0

1 % SDS

1 % 2-Mercaptoäthanol

Die ja schon in Lösung vorliegenden Myelom-L-Ketten dialysierten für 6 Stunden gegen diesen Puffer.

Die Proteinlösungen dialysierten dann über Nacht gegen Puffer 2:

0,01 NaPO_4 -Puffer, pH 7,0

0,1 % SDS

0,1 % 2-Mercaptoäthanol.

In einer Versuchsreihe wurde die Probenzubereitung variiert:

- 1) Die SDS-Konzentration wurde in Puffer 1 und 2 verdreifacht, im Gelpuffer verdoppelt.
- 2) Puffer 1 und 2 ohne 2-Mercaptoäthanol
- 3) Puffer 1 mit 1% Jodacetamid
- 4) Puffer 1 mit 1% Jodacetamid, Puffer 2 mit 0,1 % Jodacetamid
- 5) wie 4), jedoch Puffer 2 ohne 2-Mercaptoäthanol
- 6) Puffer 1 mit 1 % Jodacetamid, Puffer 2 ohne 2-Mercaptoäthanol
- 7) statt 2-Mercaptoäthanol jeweils Dithiothreitol

Die als Proben aufgetragenen Proteinmengen lagen zwischen 0,01 mg und 0,1 mg. Bei einem immunologischen Untersuchten Lauf wurden 0,5 mg pro Gel aufgetragen.

Die Probenvolumina waren 0,05 bis 0,25 ml. Probenvolumen bis 0,1 ml wurden mit Gelpuffer und Glycerin wie 1:1:1 versetzt. Bei Volumina über 0,1 ml entfiel der Gelpuffer. Immer wurden 5 μ l 0,01%iges Bromphenolblau und 5 μ l 2-Mercaptoäthanol beigegeben.

2-Mercaptoäthanol entfiel nur, wenn schon Puffer 2 keines enthielt.

- Lauf

Die Läufe wurden mit konstanter Stromstärke durchgeführt, die Anode lag in der unteren Kammer an.

Vorlauf: 2 h bei 2 mA/Gel. Probenauftrag; 30 min 2 mA/Gel, dann Lauf für 24 h bei 7 mA/Gel. In zwei Versuchen wurden kürzere Laufzeiten von 4 und 18 h gewählt.

Nach dem Lauf Fixieren der Gele für 20 Stunden in 20%iger Sulfosalicylsäure und Färbung mit wäßriger 0,25%iger Coomassie Blue R 250-Lösung für 10 bis 20 Stunden (91). Entfärbt wird in 7%iger Essigsäure für mindestens 12 Stunden.

d) Ampholine-Diskelektrophorese

Die isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidgel wurde mit zwei verschiedenen Gelsystemen erprobt. Es lag die Methode von WRIGLEY (112) zugrunde.

- Gelzubereitung

Lösung A: Temed	1,0 ml	Lösung B: Acrylamid	30,0 g
8m Urea ad	100,0 ml	Bis	0,8 g
		Urea ad	100,0 ml

Es wurden verschiedene Gelkonzentrationen an Acrylamid hergestellt:

Mischungsverhältnis für	6%ige	7,5%ige	9%ige Gele
Lösung A:	8,0 ml	10,0 ml	12,0 ml
Lösung B:	2,4 ml	3,2 ml	4,0 ml
Perlösung:	25,6 ml	22,8 ml	20,0 ml
Ampholine (40%)	4,0 ml	4,0 ml	4,0 ml

Perlösung: 85 mg Ammoniumpersulfat auf 100 ml 8 m Urea

Die angegebenen Gele haben alle eine Endkonzentration an Ampholine von 4 %. Durch entsprechende Verringerung der zugegebenen Trägerampholytmenge wurde das 7,5%ige Gel auch mit einer Ampholinendkonzentration von 1 % und 2 % benutzt.

Das zweite mit Ampholine für die isoelektrische Fokussierung erprobte Gelsystem war das auf Seite 15 für die normale Disk-elektrophorese angegebene. Lösung II (S. 15) durfte weder Tris noch HCl enthalten.

Je nach Versuchsanordnung wurden bei der Gelbereitung verschiedene pH-Bereiche des Trägerampholyten zugesetzt.

- Elektrodenlösungen

Kathode: 0,4%ige Äthanol-diaminlösung

Anode: 0,2%ige Schwefelsäurelösung

- Probenzubereitung

Die in Substanz vorliegenden Proteine wurden in 20%iger Saccharose-lösung in 8 m Urea gelöst. Den in wäßriger Lösung vorliegenden Myelom-L-Ketten wurde kristallinierte und deionisierte Urea in entsprechender Menge (zur Erzielung einer 8 m Lösung) zugegeben. Die aufgetragene Probenmenge betrug bei den Proteinen in Substanz ca. 0,2 bis 0,3 mg. Bei den Myelom-L-Ketten wurden aus technischen Gründen nur etwa 0,05 mg Eiweiß aufgetragen.

Auf die Gele wurde vor dem Lauf eine Schicht von Ampholine-Lösung entsprechend der Ampholinekonzentration im Gel zum Schutz der Gele vor der Berührung mit dem Oberpuffer aufgetragen.

- Lauf

Vorlauf 30 min bis 3 h bei 2 mA/Gel.

Probenauftrag; dann Lauf 3 bis 24 Stunden bei 2 mA/Gel (Stromstärke konstant).

Nach dem Lauf Färbung der Gele nach AWDEH (3) in 0,2%iger Bromphenolblaulösung in einem Äthanol:Wasser:Essigsäure-Gemisch im Verhältnis 50:45:5 und Entfärbung im entsprechenden Gemisch im Verhältnis 30:65:5.

Zur pH-Messung wurden die Gele mit Hilfe eines Skalpells in 24 gleich große Teile zerschnitten. Die Scheibchen wurden 3 Stunden in Aqua dest. geschüttelt, dann wurde in der Lösung mit dem Mikrogasanalysator AVL von Harnoncourt der pH-Wert bestimmt.

El "Trägerfreie" isoelektrische Fokussierung

1) Geräte

LKB Säule 110 ml Typ LKB 8100-1

Gradientenmischer LKB 8121

Ultrorac (gekühlt) LKB 7000-314

Uvicord II LKB 8300 280 nm

peristaltische Pumpe LKB 49/21

Netzgerät LKB 3371 D alles LKB Producter (s.o.)

Nach der Methode von VESTERBERG und SVENSSON (105) wurde der IEP normaler L-Ketten bestimmt.

- Elektrodenlösungen

Es wurden zwei Stammlösungen unterschiedlicher Dichte hergestellt:

Dichte Lösung: 28,0 g Saccharose

Leichte Lösung:

3,75 ml Ampholine pH 3-10

60,0 ml deion.Urea

ad 60,0 ml deion.Urea (8 m)

1,26 ml Ampholine

- Probenzubereitung

Der Bichten Lösung wurden ca. 20 mg L-Ketten zugesetzt.

- Lauf

Der Gradient wurde mit dem Gradientenmischer nach SVENSSON und PETERSSON (95) unter gleichzeitiger Füllung der Säule mit einer peristaltischen Pumpe aufgebaut. Die oben gelegene Anode befand sich in 0,2%iger H_2SO_4 in Urea mit 12 g Saccharose, die Kathode in 0,4%iger Äthanolaminlösung in 8 m Urea. Die Trennung wurde bei 4°C und einer Spannung von 500 Volt für 48 Stunden vollzogen.

Nach Abschluß des Laufes wurde die Säule mit der peristaltischen Pumpe geleert und mit dem Uvicordgerät fortlaufend der Eiweißgehalt des Eluats bestimmt. Es wurden Fraktionen a 5 ml geschnitten. Der Eiweißgehalt der Fraktionen wurde anschließend nochmals mit dem Spektralphotometer überprüft und ihr pH-Wert mit dem Knick pH-Meter bestimmt.

Diese Fraktionen wurden mit Polyäthylenglykol auf 1/5 Volumen eingengt und diskelektrophoretisch auf ihren IEP hin aufgetrennt, bzw. immunologisch untersucht.

F) Immunologische Untersuchungen der Gele

Diskelektrophoretisch im SDS- und Ampholine-Milieu aufgetrennte L-Ketten wurden wie folgt in Anlehnung an OUCHTERLONY (69, 70) untersucht.

Die Gelabschnitte, in denen beim Färben parallel gelaufener Gele Proteinbanden festgestellt waren, wurden in dünne Scheiben einge-

teilt. Diese Scheiben wurden jeweils in die Mitte eines Quadrates von 6 cm x 6 cm auf eine Glasplatte gelegt und mit Agar umgossen.

In einer Entfernung von 1 cm wurden radiär mit einem dünnen Korkbohrer Löcher für die Antiseren gestanzt. Nachdem den Proteinproben 24 h in der feuchten Kammer Gelegenheit gegeben war, in den Agar zu diffundieren, wurden die Antiseren (anti L- κ , anti L- λ , anti H, anti F_{ab} und anti F_c) aufgetragen. Nach weiteren 24 Stunden in der feuchten Kammer wurden die Platten für 24 h in physiologische Kochsalzlösung gelegt und dann gefärbt.

Die einzelnen bei den LKB-Säulenläufen gewonnenen, eingeengten Fraktionen wurden in der immunoelektrophoretischen Methode nach SCHEIDEGGER (90) mit den zuletzt genannten Antiseren untersucht.

Ergebnisse

Bei den vergleichenden Untersuchungen von normalen Einzelseren S. und Sch. mit gepoolten Serum ergaben sich in keinem Fall Unterschiede, so daß im folgenden gleichberechtigt von Normalserum, Poolserum oder Sammelserum gesprochen werden kann.

ad A) und C) Gewinnung von immunologisch reinem Ig G

Die Isolierung von reinem Ig G ist oben beschrieben. Abb. 3 zeigt das Elutionsprofil eines typischen Laufes: zur immunologischen Reinheitsprüfung des Eluats mit Antiseren gegen anti-Vollserum, anti-Ig G, A und M, anti- β -Lipoprotein, anti-Ig M und anti-Ig G siehe Abb. 4. Es zeigt sich jeweils nur die für Ig G charakteristische Immunpräzipitatsbande.

ad B) und C) Gewinnung von immunologisch reinen H- und L-Ketten

Abb. 5 stellt ein typisches Elutionsprofil der Auftrennung des zuvor reduzierten und alkylierten Ig G in seine Bausteine, die H- und L-Ketten, an Sephadex G 100 dar. Abb. 6 weist die Reinheit der L-Ketten nach und zeigt, daß sie aus einem Gemisch von κ - und λ -Ketten bestehen. Die entsprechenden Ergebnisse für H-Ketten sind ohne Abbildung.

Bei den aus den Myelomseren gewonnenen L-Ketten sind bei Be. und Mo. nur L_{κ} -, bei Ba. nur L_{λ} -Ketten nachzuweisen. Bei den L-Ketten Lö. handelt es sich um Myelom-L-Ketten vom κ -Typ, die einen immunologisch nachweisbaren Anteil an normalen L-Ketten haben. Abb. 7 zeigt die Ergebnisse für die Myelom-L-Ketten Ba. und Mo., Be. und Lö. sind ohne Abbildung.

ad C) Diskelektrophorese

b) "normale" Diskelektrophorese

In der "normalen" Polyacrylamiddiskelektrophorese wurden L-Ketten von Normalserum mit den aus Plasmocytomseren gewonnenen verglichen (Abb. 8). Es zeigen sich bei normalen L-Ketten 8 Banden. Allerdings sind auch bei allen vier Myelom-L-Ketten mehrere Banden sichtbar. Besonders deutlich ist das für Ba., dessen 7 Banden gegenüber den normalen L-Ketten nach oben verschoben - also im elektrischen Feld langsamer - sind.

Noch stärker kathodenwärts liegen die drei Banden von Lö. und die

EXT, 280 nm

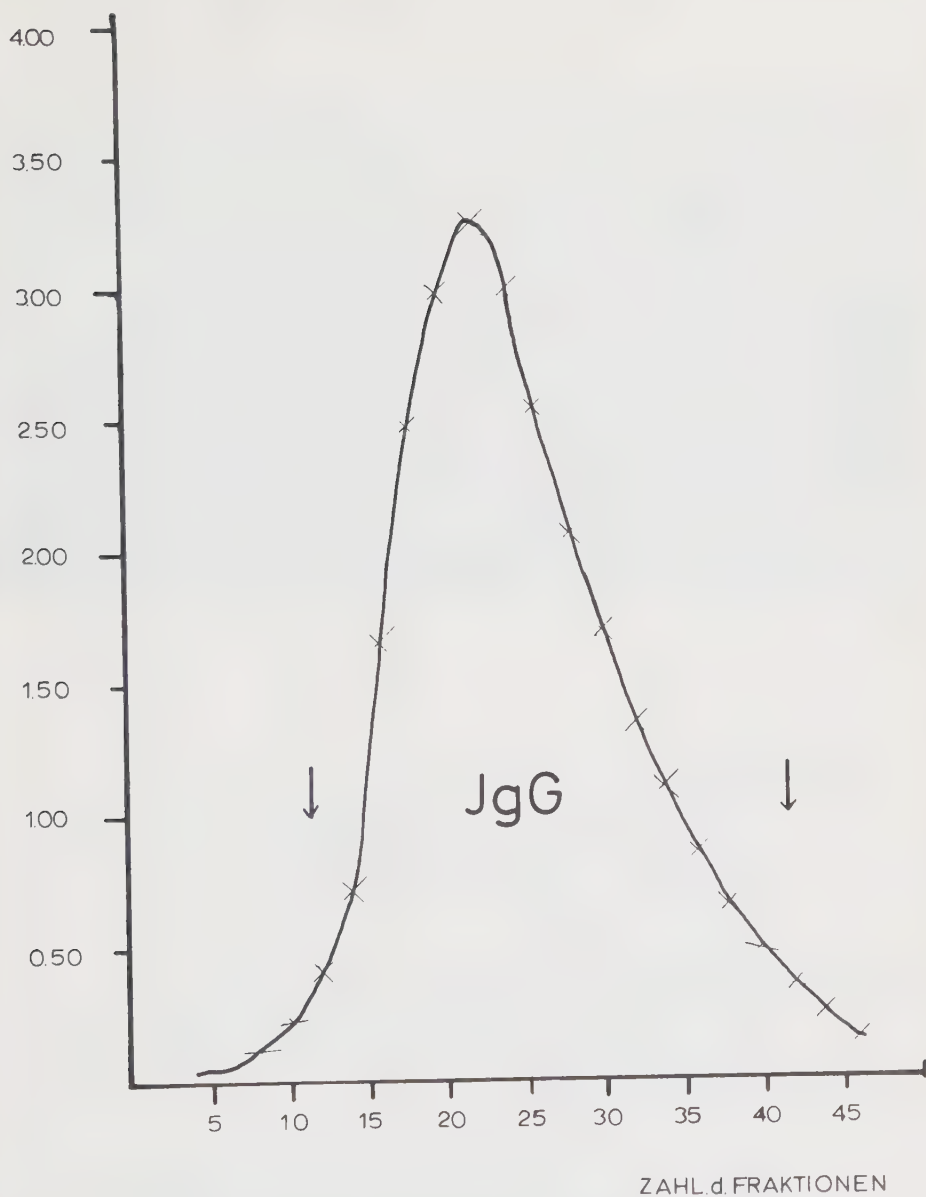


Abb. 3: Elutionsprofil von immunologisch reinem Ig G nach Trennung über QAE-Sephadex.
Die Pfeile zeigen an, welcher Teil des Eluats weiter verarbeitet wurde. Eine Fraktion umfaßt 150 Tropfen $\approx 7,5$ ml.

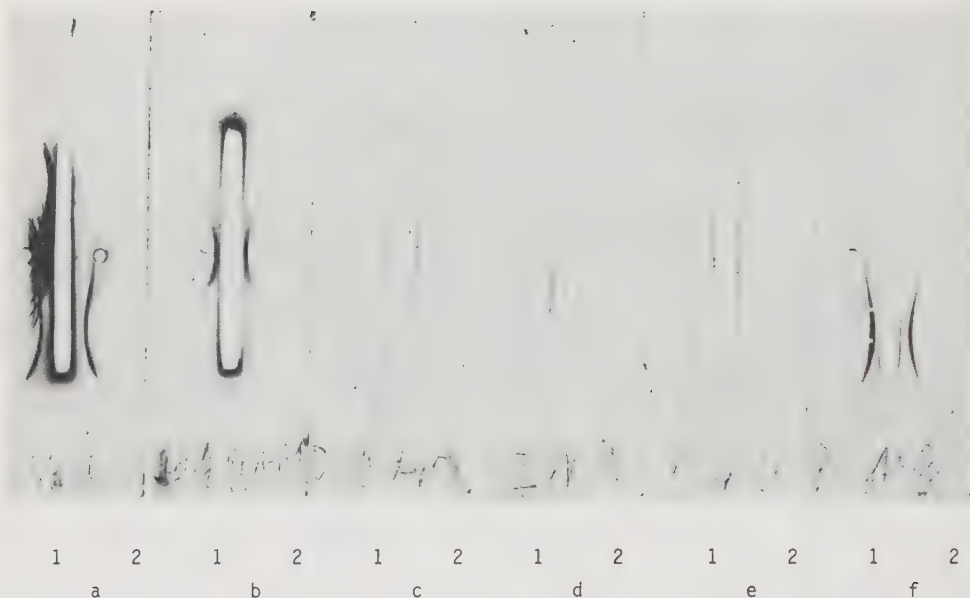


Abb. 4: Immunologische Reinheitsprüfung von Ig G.

Auf den mit 1 bezeichneten Seiten der Objektträger ist Normalserum, auf den mit 2 bezeichneten die Ig G-Probe aufgetragen. Die Antiseren sind für:

- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| a) anti-Vollserum, | b) anti-G, A und M, |
| c) anti- β -Lipoprotein, | d) anti-Ig A, |
| e) anti-Ig M und | f) anti-Ig G. |

Die Ig G-Probe zeigt nur mit anti-Ig G-Antiserum bzw. dem ansprechenden Anteil des polyvalenten Antiserums (b) ein Immunpräzipitat.

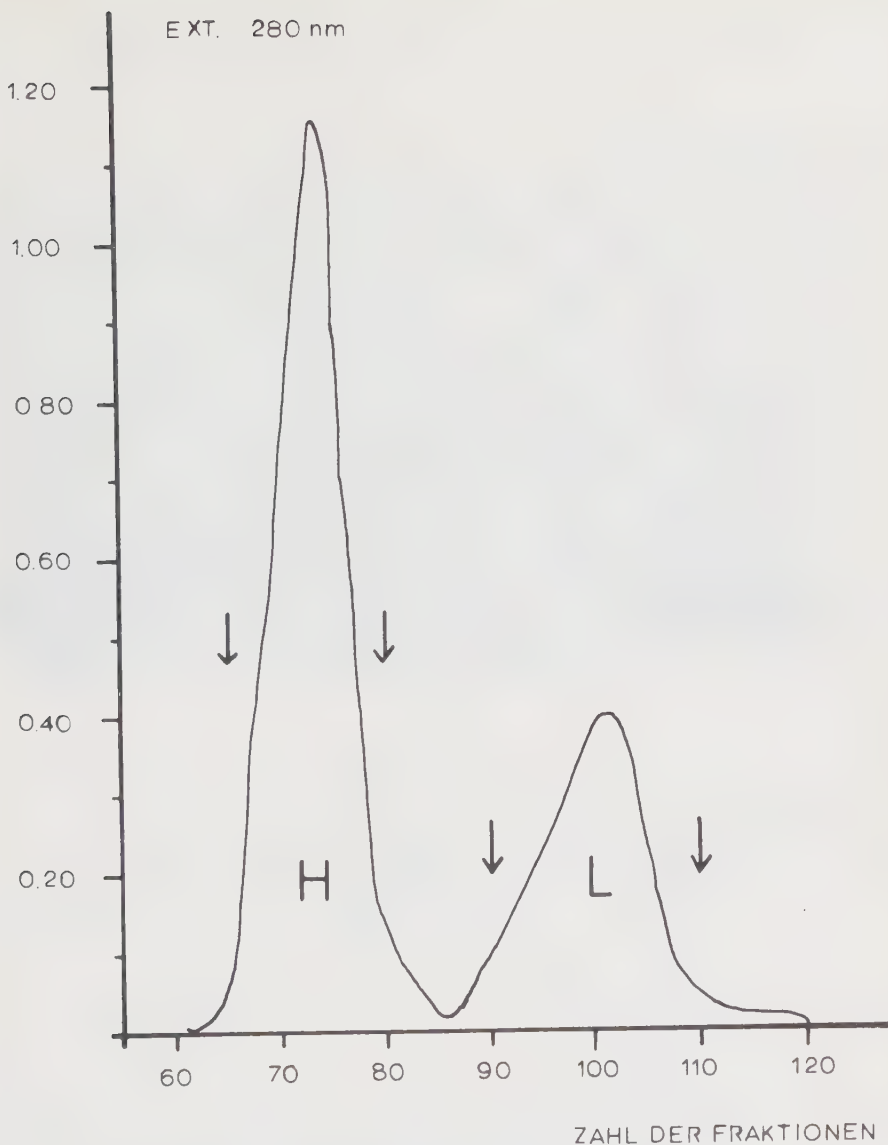


Abb. 5: Elutionsprofil von immunologisch reinen H- und L-Ketten nach Trennung über Sephadex G 100.

Die Pfeile bezeichnen, welche Anteile der beiden Peaks gesammelt wurden. Eine Fraktion umfaßt 150 Tropfen $\approx 7,5$ ml.

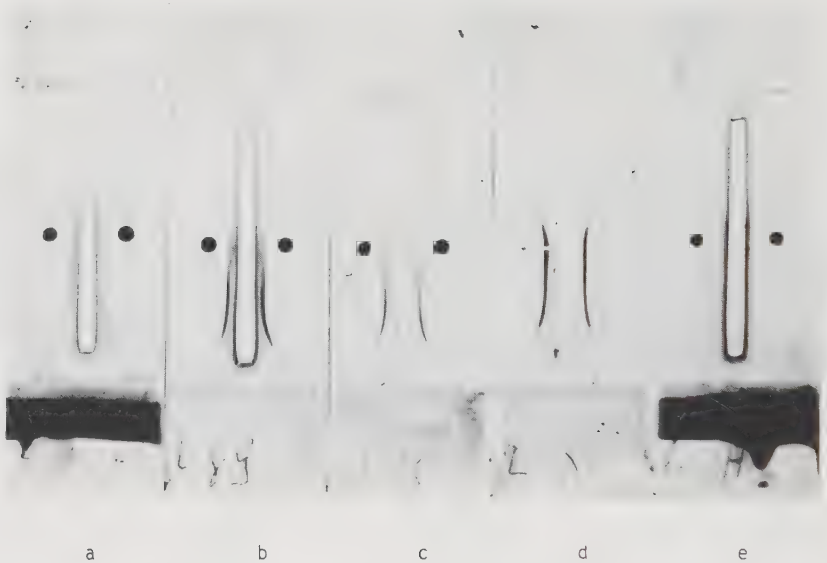


Abb. 6: Immunologische Reinheitsprüfung der L-Ketten, (analoge Bilder gelten für H-Ketten - o. Abb.).
 L-Ketten - Proben sind auf beiden Seiten der Objektträger aufgetragen. Die Antiseren sind für:

- a) anti-Vollserum,
- b) anti-Ig G,
- c) anti-L κ ,
- d) anti-L λ ,
- e) anti- γ -Kette.

Die L-Ketten - Proben ergeben lediglich mit den L-Ketten spezifischen Teilen der Antiseren Immunpräzipitate.

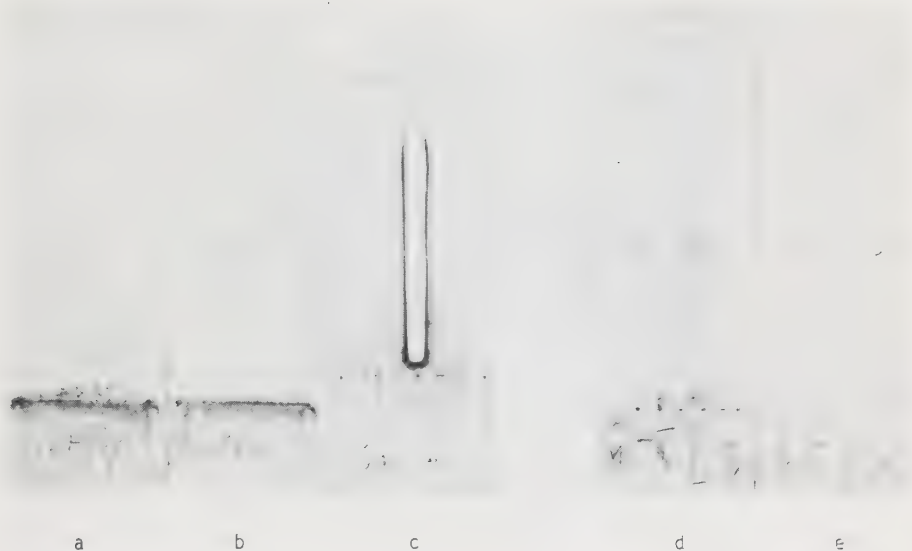


Abb. 7: Immunologische Untersuchung des Typs der Myelom-L-Ketten.
Gleiche Myelom-L-Ketten-Proben sind auf beiden Seiten der Objektträger aufgetragen. Die Bilder a - c zeigen die Ergebnisse für die Myelom-L-Ketten Ba., d und e für Mo.
Be. und Lö. sind ohne Abbildung.

Die Antiseren sind für:

- a) anti- L_K ,
- b) anti- L_λ ,
- c) anti- γ -Kette,
- d) anti- L_K ,
- e) anti- L_λ .

Die L-Ketten Ba. erweisen sich als vom λ -Typ (b), die L-Ketten Mo. als vom K -Typ (d).

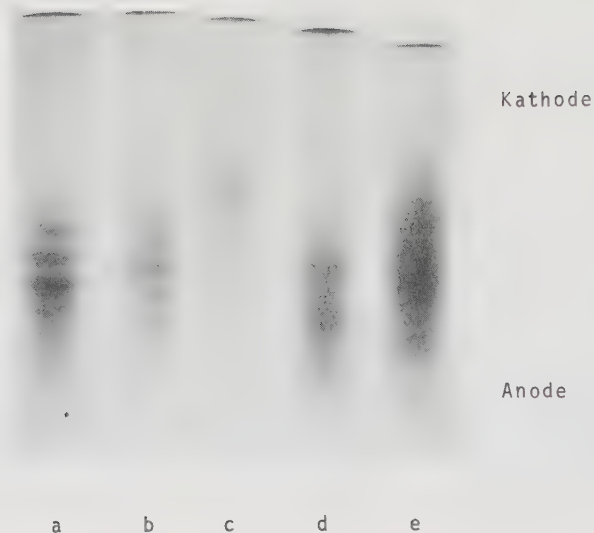


Abb. 8: "Normale" Diskelektrophorese: L-Ketten.

a) normale L-Ketten, b) - e) Myelom-L-Ketten.

b) Ba., c) Be., d) Mo. und e) Lö.

fünf von Be. Die drei ausgeprägten Banden von Mo. hingegen sind etwa in der Gegend normaler L-Ketten, nur weiter auseinander gezogen zu finden.

c) SDS-Diskelektrophorese

Zunächst wurde in parallelen Ansätzen geprüft, ob die Versuchsergebnisse durch die Verwendung von 8 m wäßriger Urea als Lösungsmittel anstelle von Aqua dest. verändert würden. Dies war nicht der Fall. Da die Löslichkeit vor allem von H- aber auch von L-Ketten in der Urealösung wesentlich besser war, wurden die Versuche nur in diesem Medium durchgeführt.

Nach SHAPIRO al. (91) wurden die Molekulargewichte von H- und L-Ketten in bezug zu den Referenzproteinen ermittelt. Probenmengen von jeweils 0,01 mg Protein - bei H- und L-Ketten zusätzlich Mengen von 0,03 und 0,05 mg - wurden im parallelen Lauf untersucht. Die Abbildung (Abb. 9) stellt auf der Abszisse die relative Beweglichkeit der Proben dar (Chymotrypsinogen gleich 1,0 gesetzt). Auf der Ordinate ist dann das zugehörige Molekulargewicht abzulesen.

Es ergeben sich folgende Werte (Vergleich: Literatureigener Versuch)

Tabelle 1

Protein	MG in Literatur (108)	MG nach o.a. Versuch
Cytochrom C	11.700	11.800
L-Kette	ca. 23.500	22.500
Chymotrypsinogen	25.700	25.000
Aldolase	40.000	40.000
Ovalalbumin	43.000	43.000
L-Dimer		47.000
H-Kette (von Ig G)	50.000	49.500
Catalase	60.000	52.000
Albumin	68.000	67.700
H-Dimer		98.000

Ein H- und L-Ketten Dimer konnte jeweils bei den auf 0,03 und 0,05 mg vermehrten Probenauftragungen festgestellt werden.

In Abb. 10 sind die Ergebnisse der SDS-Diskelektrophorese der Myelom-L-Ketten abgebildet.

Obzwar hier verhältnismäßig große Probenmengen von ca. 0,03 bis 0,06 mg Protein verwandt wurden, zeigen Ba., Be. und Lö. jeweils nur eine Bande, liegen also als Monomer vor. Lediglich die L-Ketten

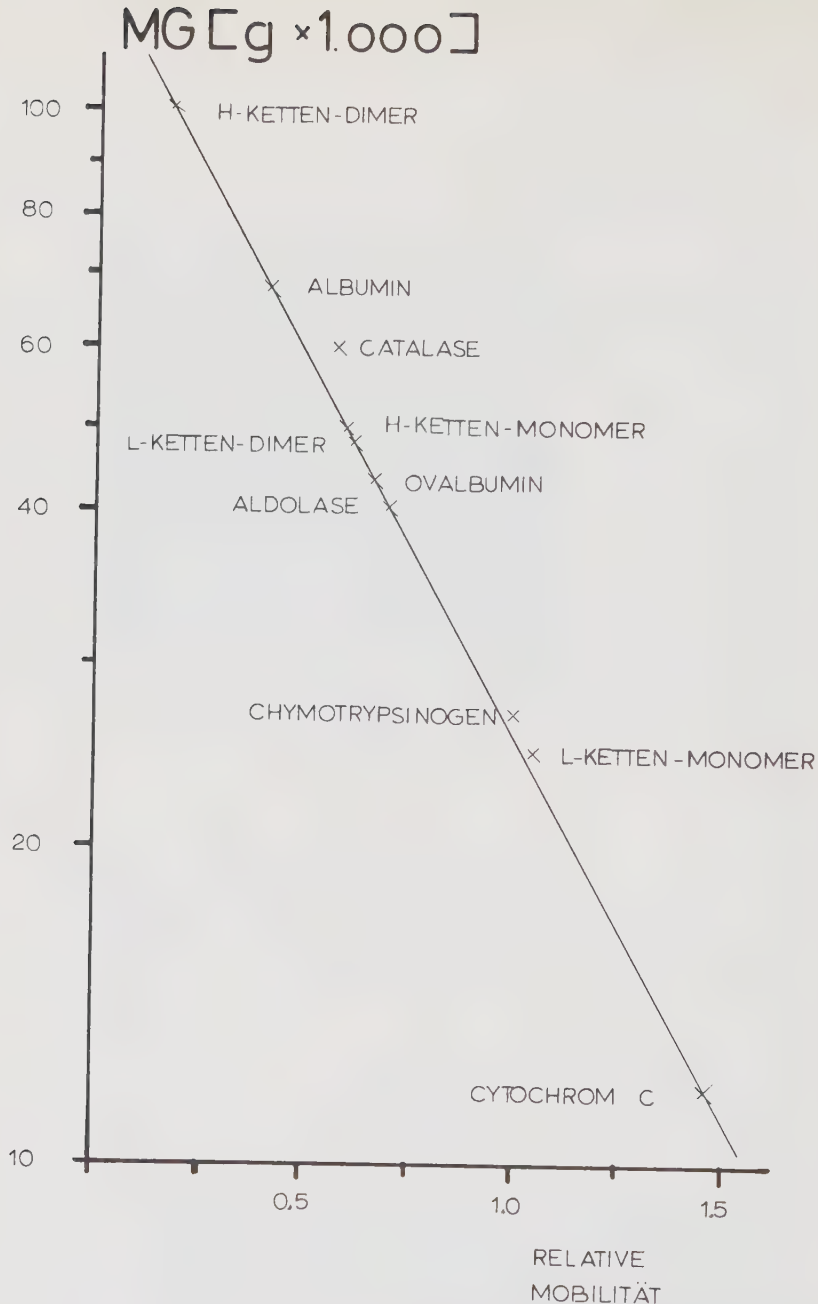


Abb. 9: Diagramm einer SDS-Diskelektrophorese zur Bestimmung des MG von H- und L-Ketten anhand von Referenzproteinen. Die Wanderungsstrecke von Chymotrypsinogen im Gel ist gleich 1,0 gesetzt, die der anderen Proteine darauf bezogen.

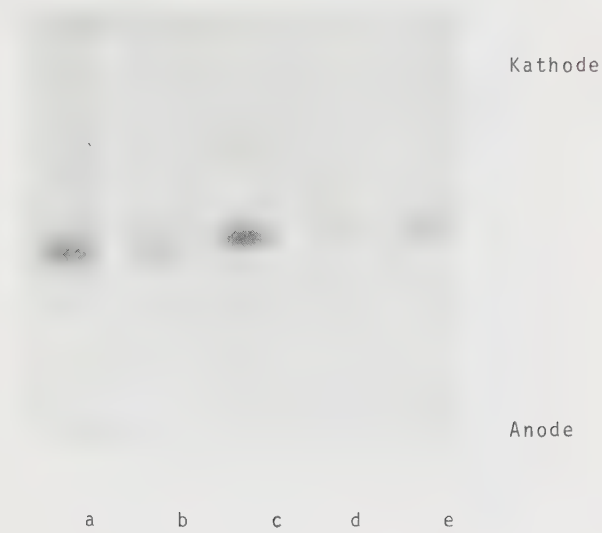


Abb. 10: SDS-Diskelektrophorese: L-Ketten.

a) normale L-Ketten, b) - e) Myelom-L-Ketten.

b) Be., c) Mo., d) Ba. und e) Lö.

von Mo. weisen in der SDS-Diskelektrophorese drei Banden auf. Die hier bestimmten Molekulargewichte der Myelom-L-Ketten liegen zwischen 21.000 und 25.000.

Die weiteren Untersuchungen galten der oben beschriebenen H- und L-Ketten-Polymerenbildung. Es wurde vermutet, daß diese Polymerenbildungen nur bei höheren Probenmengen nachweisbar sind.

Albumin wurde in verschiedenen Probenmengen von 5, 10, 20, 40 und 100 μ g aufgetragen und es ergab sich das Bild der Abb. 11.

Ein anderes Beispiel zeigt Abb. 12. Hier handelt es sich um H-Ketten, L-Ketten, Albumin und Aldolase in einer Auftragsmenge von 0,1 mg pro Gel nach 24stündiger Laufzeit. Ein aufgrund dieses Versuchs erstelltes Molekulargewichtsdiagramm (Abb. 13) weist die zusätzlichen Banden eindeutig als Di- und Polymere aus. In dem Diagramm sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht alle im Versuch sichtbaren Polymeren eingetragen.

Die Variationen der SDS-Diskelektrophorese mit 2-Mercaptoäthanol und Jodacetamid zur vollständigen Reduzierung der S-S-Brücken und Alkylierung zeigten immer noch eine Polymerenbildung. Es wurde dabei z.B. nach Herstelleranweisung eine Oxidation des 2-Mercaptoäthanol durch Luftsauerstoff nach Möglichkeit vermieden. Auch die Verwendung von Dithiothreitol, das von CLELAND (14) als sehr gutes, SH-Gruppen schützendes Reagenz beschrieben wird, verhinderte Polymerenbildung nicht.

Diese Bildung von zusätzlichen Polymerenbanden in der SDS-Diskelektrophorese konnte bei Verwenden von größeren Proteinproben (0,1 mg) in gleicher Weise bei Cytochrom C, Chymotrypsinogen, Ovalbumin und Catalase beobachtet werden. Von den untersuchten Referenzproteinen machte hier nur die Aldolase, die in der Regel als Monomer auftrat, eine Ausnahme.

An verschiedenen langen Gelen wurde der Einfluß der Gellänge (3,5 cm, 4 cm und 5 cm) und der Probenmenge auf die Laufstrecke untersucht (Abb. 14).

Es wurden 0,06 und 0,15 mg Protein aufgetragen. Die mehr als doppelte Proteinmenge ergab bei vergleichbaren Gelen keinen Unterschied in der Laufstrecke, die Banden waren lediglich stärker. Mit zunehmender Gellänge nahm die Motilität der Proben etwas zu. Die Molekulargewichtsbestimmung wird dadurch nicht gestört.

Bei der Gelfiltration über Sephadex G 15, G 25, G 50, G 75 und G 100



Abb. 11: SDS-Diskelektrophorese: Albumin - Vergleich von verschiedenen Probenauftragungsmengen in Hinsicht auf die Anzahl der Banden.

Probenauftragmenge in μg : a) 5, b) 10, c) 20,
d) 40 und e) 100.

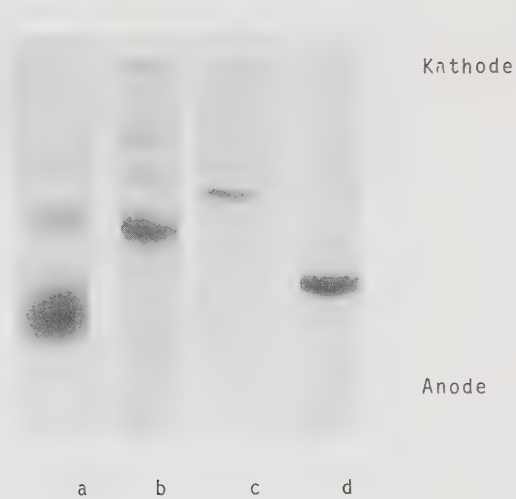


Abb. 12: SDS-Diskelektrophorese: H- und L-Ketten im Vergleich mit Referenzproteinen.

a) H-Ketten, b) L-Ketten, c) Albumin und d) Aldolase.

MG [g x 1.000]

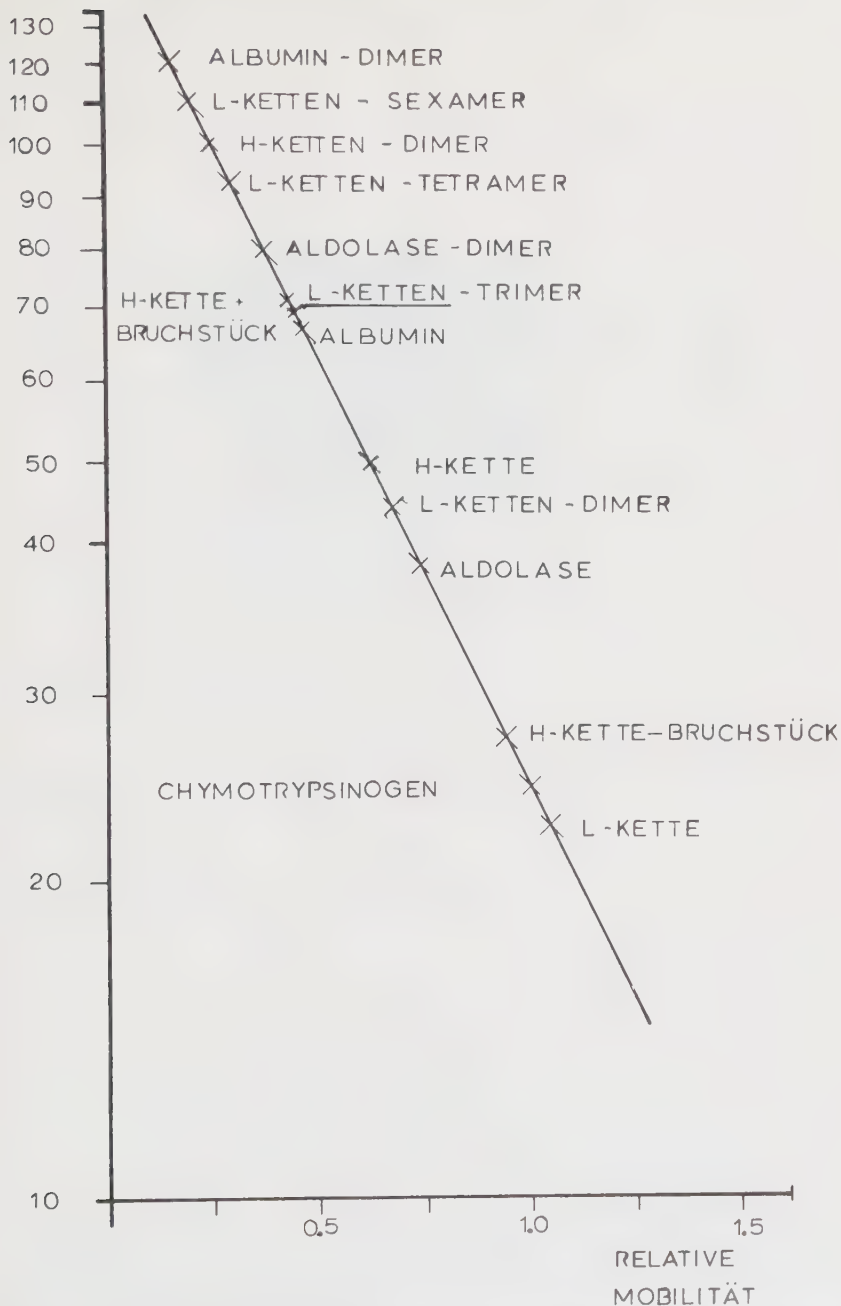


Abb. 13: Polymerenbildung in der SDS-Diskelektrophorese bei Probenauftragmengen von 0,1 mg.

Die Wanderungsstrecke von Chymotrypsinogen im Gel ist gleich 1,0 gesetzt, die der anderen Proteine darauf bezogen.

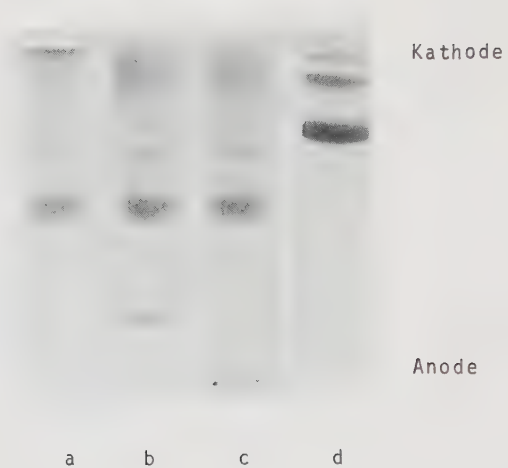


Abb. 14: SDS-Diskelektrophorese: Einfluß der Gellänge auf die Laufstrecken der Proteine im parallelen Ansatz.
a - c Chymotrypsinogen, d) Albumin zum Vergleich.

von normalen L-Ketten in Phosphatpuffer mit SDS und 2-Mercapto-
äthanol konnte immer nur ein scharf begrenzter Peak eluiert wer-
den.

d) Isoelektrische Fokussierung in der Diskelektrophorese

Wie in der Methodik angegeben, wurden Gelsysteme in Anlehnung an
WRIGLEY (112) und an REISFELD und SMALL (87) benutzt. Hier zunächst
die Versuchsergebnisse mit Gelen nach REISFELD und SMALL (87).
Ein pH-Gradient in den Gelen konnte nur aufgebaut werden, wenn Lö-
sung II ohne Tris und HCl angesetzt wurde. Bei einem Lauf mit Tris
und HCl stellten sich alle untersuchten Proteine auf einer Gelhöhe
in einer Bande ein, in leeren Gelen kam es zu artifiziellen Banden.
Zudem erhielt man nur brauchbare Ergebnisse, wenn die Läufe in Urea
durchgeführt wurden.

Das Ergebnis eines solchen Laufs mit 30 min Leerlauf und drei Stun-
den Trennung zeigt Abb. 15. (Die Anode befindet sich unten).

Bei gut aufgebauten pH-Gradienten werden in diesem Versuch die L-
Ketten kaum aufgetrennt.

Abb. 16 zeigt den Einfluß der Ampholinendkonzentrationen in den Ge-
len (1%, 2% und 4%) auf den pH-Gradienten. Die weiteren Versuche
wurden mit 4%iger Ampholinendkonzentration durchgeführt. Während
Abb. 16 für den Gradienten des pH-Bereichs pH 3 - 10 gilt, zeigen
die Abb. 17 und 18 die Gradienten für die ebenfalls benutzten Am-
pholinbereiche pH 7-9, 5-8 und 3-6.

Abb. 19 stellt nochmals Bilder von L-Ketten dar, die in dem oben be-
schriebenen Gelsystem aufgetrennt wurden. Die verbesserte Trennung
wurde durch einen auf 3 Stunden verlängerten Vorlauf erreicht.

Im pH-Bereich 5 - 8 sind so insgesamt 10 Banden sichtbar. Nun die
Versuche mit den Gelangaben nach WRIGLEY (112). Bei Gelen von 7,5 %
und 9 % erfolgte nur eine ungenügende Auftrennung der L-Ketten.
Gute Auftrennung ließ sich mit 6%igen Gelen und verlängerten Lauf-
zeiten (12 bis 24 Stunden) erzielen. Die lange Laufzeit mit der am
Ende anliegenden hohen Spannung bedingte, daß die in 8 m Urea ange-
setzten Gele brüchig wurden, was die zum Teil verminderte Qualität
der photographischen Dokumentation erklärt, die Auswertung aber
nicht wesentlich beeinträchtigt. Auf den hier vorgelegten Gelphoto-
graphien sind in der Regel weniger Banden zu erkennen, als im Text
angegeben. Dies resultiert aus den sehr unterschiedlichen Dichten
der einzelnen Banden. Da mit den Reproduktionen ein Kompromiß im

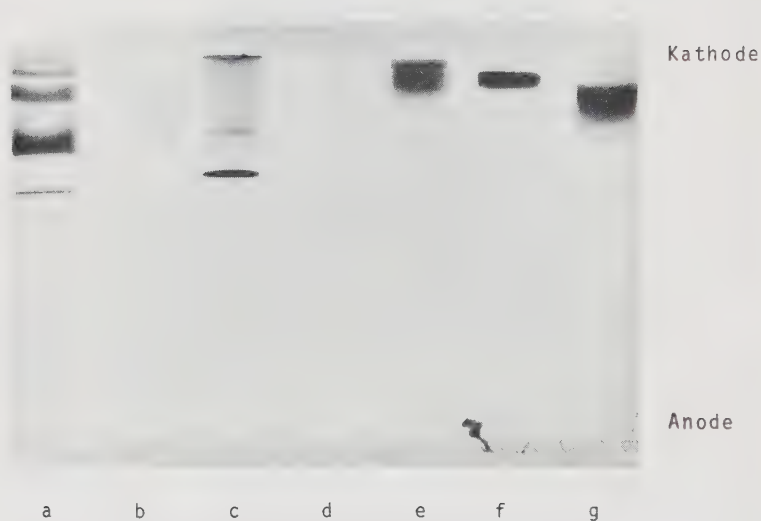


Abb. 15: Isoelektrische Fokussierung: L-Ketten und Referenzproteine

- a) Albumin,
- b) Chymotrypsinogen,
- c) Ovalbumin,
- d) Cytochrom C,
- e) Catalase,
- f) Aldolase,
- g) L-Ketten.

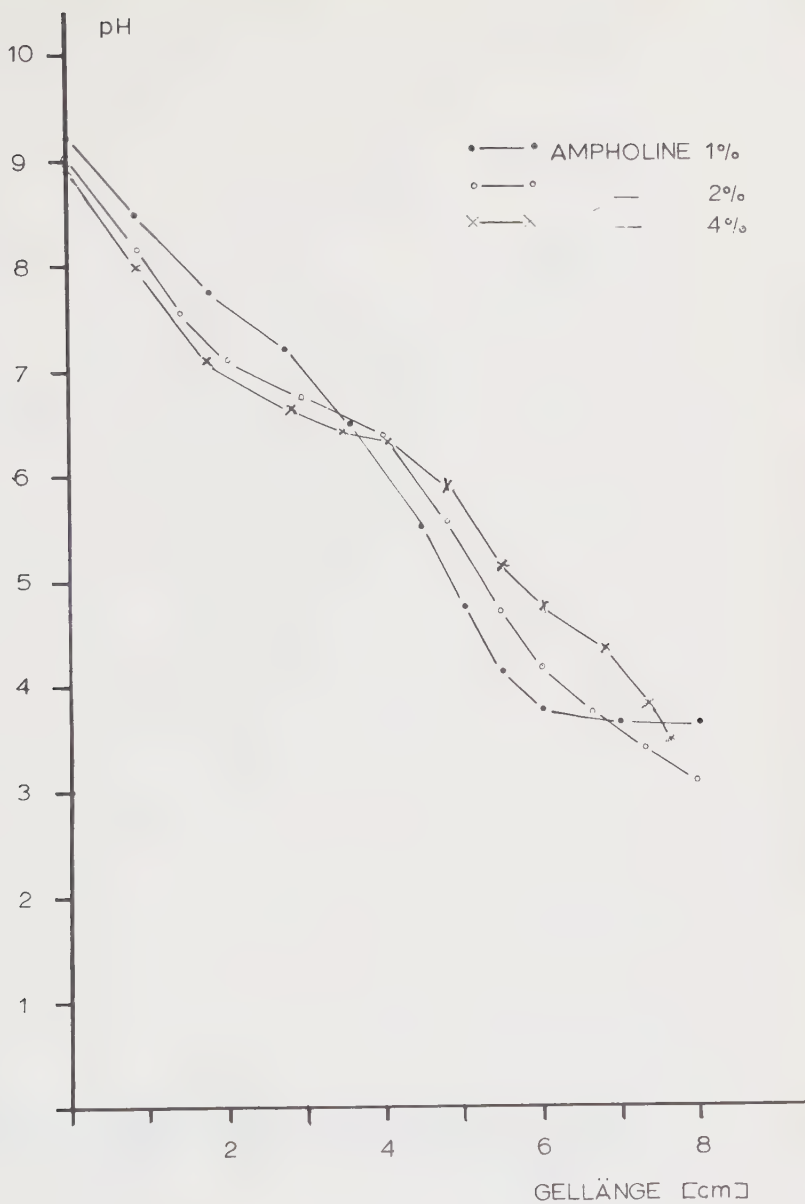


Abb. 16: Isoelektrische Fokussierung: pH-Wertverlauf in Abhängigkeit von der Gellänge: Einfluß verschiedener Ampholinekonzentrationen auf den Kurvenverlauf. Kathode am oberen Gelpol.

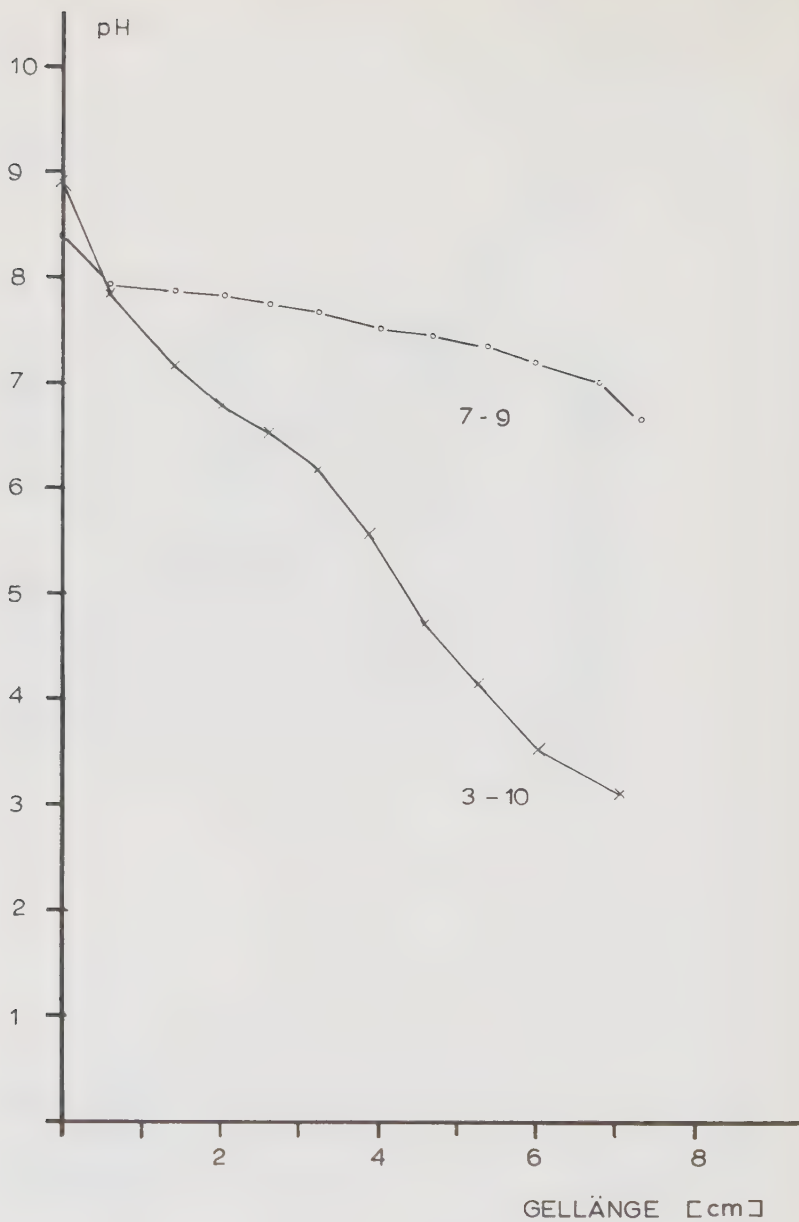


Abb. 17: Isoelektrische Fokussierung: pH-Wertverlauf in Abhängigkeit von der Gellänge: pH-Bereiche 7 - 9 und 3 - 10. Kathode am oberen Gelpol.

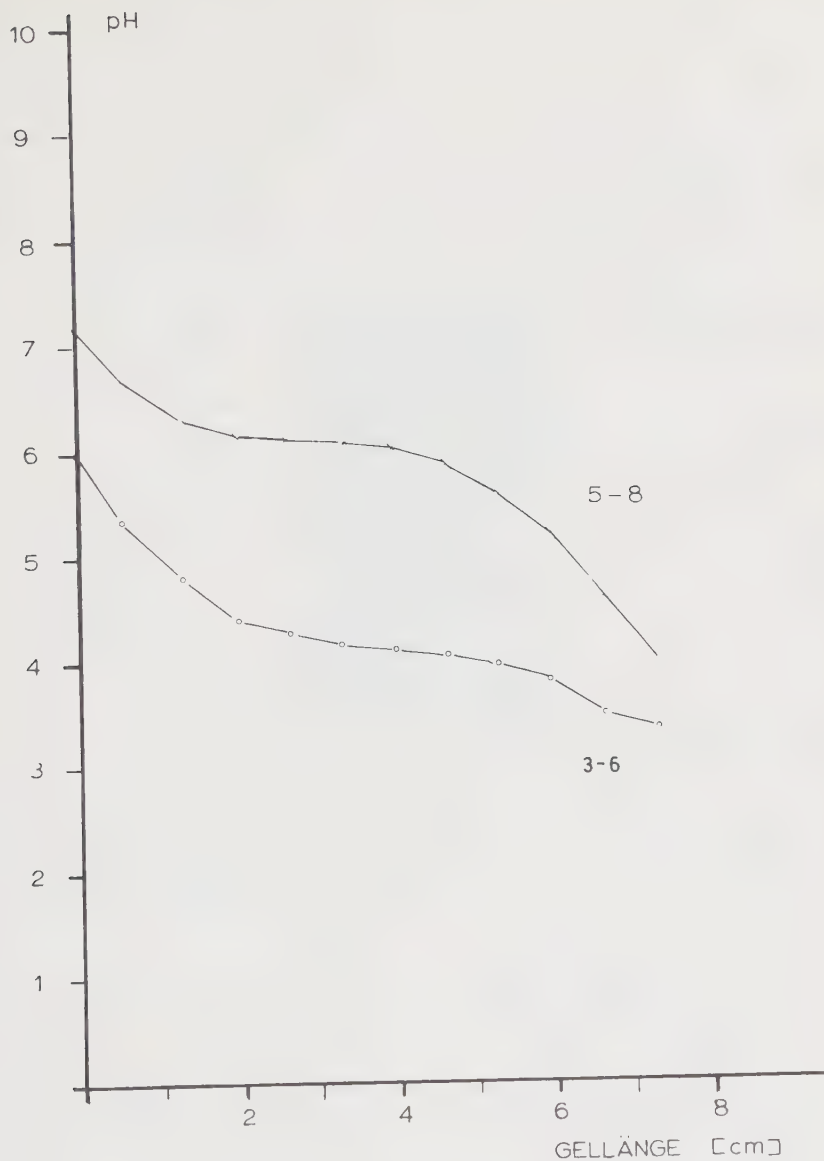


Abb. 18: Isoelektrische Fokussierung: pH-Wertverlauf in Abhängigkeit von der Gellänge: pH-Bereiche 5 - 8 und 3 - 6. Kathode am oberen Gelpol.

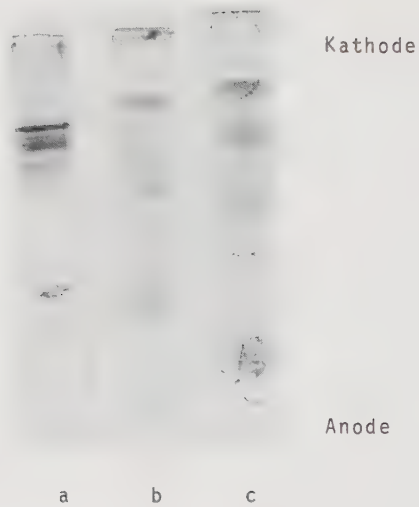


Abb.19: Isoelektrische Fokussierung: normale L-Ketten.

pH-Bereiche:

a) 3 - 10,

b) 5 - 8,

c) 7 - 9.

Bereich mittlerer Lichtwerte erzielt werden muß, entfällt dadurch die Wiedergabe der nur schwach erkennbaren Banden.

Das Bild einer typischen L-Ketten-Auftrennung zeigt Abb. 22; zugehörige pH-Kurven Abb. 20 und 21. Nach zwei Stunden Leerlauf bei 2 mA/Gel (die Spannung stieg in dieser Zeit von anfangs 60 V auf 110 V) - wurden die Proben aufgetragen und die Trennung für 18 Stunden durchgeführt. Bei weiterhin konstanter Stromstärke stieg dabei die Spannung bis auf 400 V, ein für die Ampholine-Diskelektrophorese charakteristisches Verhalten, das durch die Natur der Trägerampholine bedingt ist.

Bei diesem Versuch befand sich die Anode in der oberen Trennkammer. Führt man den gleichen Versuch unter Vertauschung der Elektroden durch, so ergibt sich, was Bandenverteilung und pH-Gradienten angeht, eine exakt spiegelbildliche Verteilung (siehe Abb. 23, zugehörige pH-Kurven in den Abb. 17 und 18).

Auf diesen Gelen kann man nach Färbung 16 verschiedene Banden von L-Ketten unterscheiden.

Abb. 24 zeigt im Vergleich 2 Gele aus verschiedenen Läufen.

Das Gel a wurde für 18 Stunden mit aufgeschichteter Probe elektrofokussiert, das Gel b für 12 Stunden mit einpolymerisierter Probe. Es wird deutlich, daß auch diese wesentlich veränderte Art der Probeneinbringung kein verändertes Elektrophoresebild bewirkt.

Abb. 25 gibt einen weiteren 12-Stunden-Lauf mit 1 Stunde Vorlauf wieder, bei dem L-Ketten im pH-Bereich 3 - 10 mit Referenzproteinen und H-Ketten gezeigt werden.

Tabelle 2

Für die Referenzproteine sind folgende IEP's abzulesen:

pH-Wert	Versuch	Literatur (mit Stelle)
Cytochrom C	10,0	10,0 (33)
Chymotrypsinogen	5,5 - 9,0	Chym.A 9,1 B 5,2 (110)
Aldolase	5,4 - 7,0	
Ovalbumin	4,9 - 5,1	4,6 - 4,8 (62)
Catalase	4,8	
Albumin	5,1 - 5,7	5,0-5,85 (39) 4,7-5,6 (85)

In Tabelle 3 sind die hier bestimmten IEP's für L- und H-Ketten sowie für Ig G im Vergleich zur Literatur ersichtlich.

Hinzu kommen die in einem 12-Stunden-Lauf im Vergleich mit L-Ketten

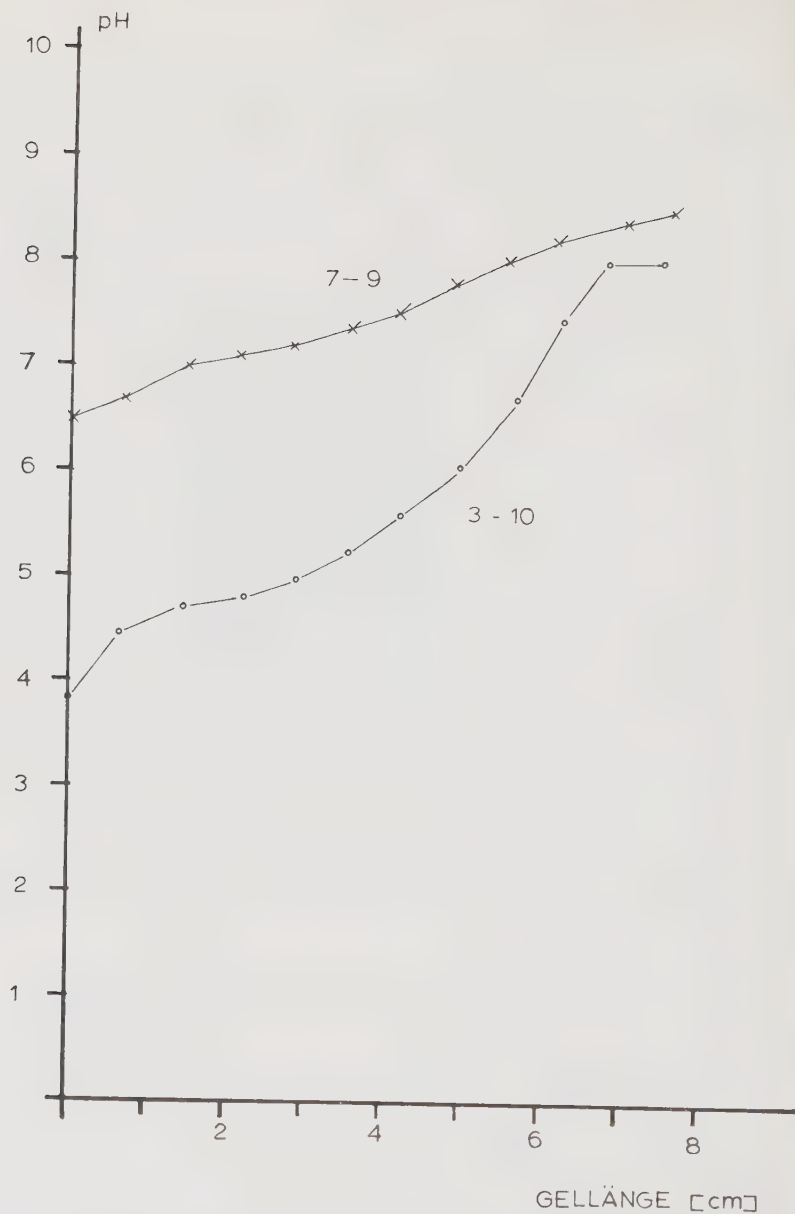


Abb. 20: Isoelektrische Fokussierung: pH-Wertverlauf in Abhängigkeit von der Gellänge: pH-Bereiche 7 - 9 und 3 - 10.
Anode am oberen Gelpol.

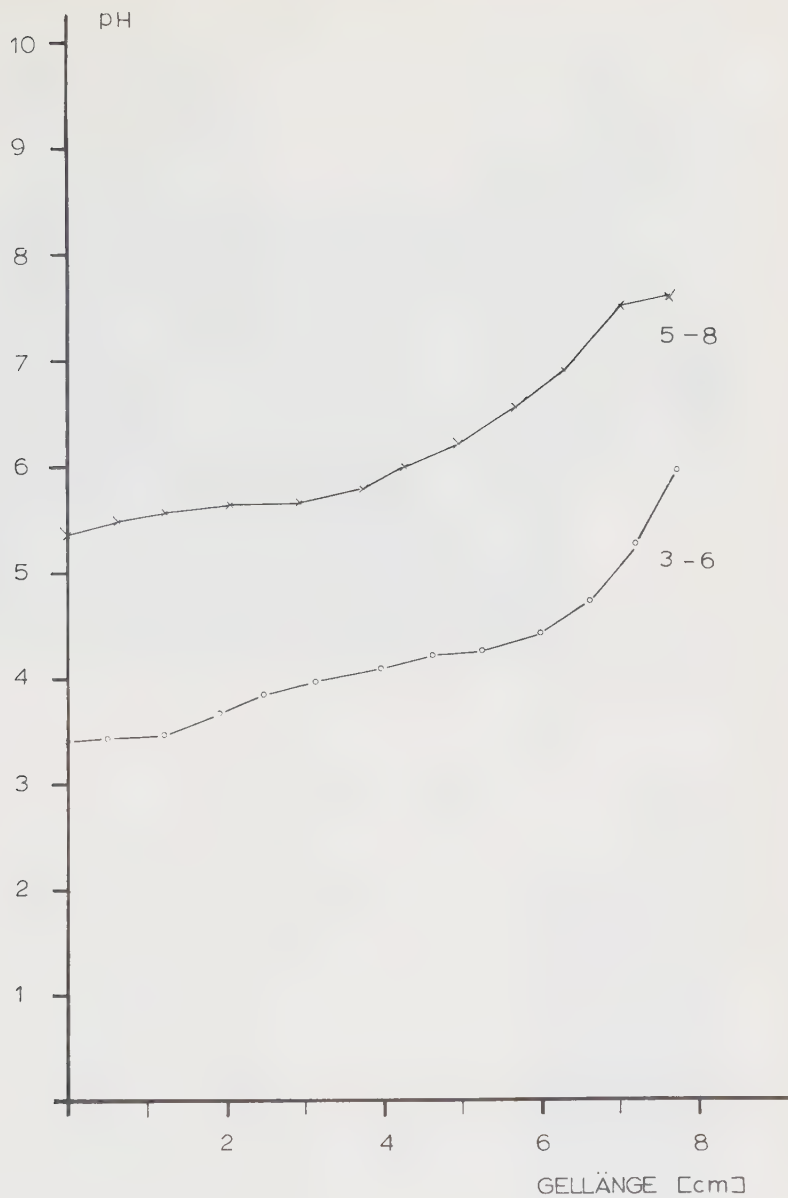
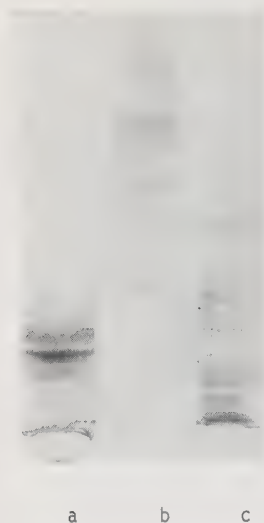


Abb. 21: Isoelektrische Fokussierung: pH-Wertverlauf in Abhängigkeit von der Gellänge: pH-Bereiche 5 - 8 und 3 - 6.
Anode am oberen Gelpol.



Anode

Abb. 22

Kathode

a

b

c



Kathode

Abb. 23

Anode

a

b

c

Abb. 22: Isoelektrische Fokussierung: L-Ketten - Anode oben.
pH-Bereiche: a) 3 - 10, b) 7 - 9 und c) 5 - 8.

Abb. 23: Isoelektrische Fokussierung: L-Ketten - Anode unten.
pH-Bereiche: a) 3 - 10, b) 7 - 9 und c) 5 - 8.

Bei Umkehrung der Stromrichtung zeigt sich ein spiegelbildliches Ergebnis.



Anode

Abb. 24

Kathode

a

b

Abb. 24: Isoelektrische Fokussierung: L-Ketten - Anode oben.
a) aufgeschichtete Probe,
b) einpolymerisierte Probe.

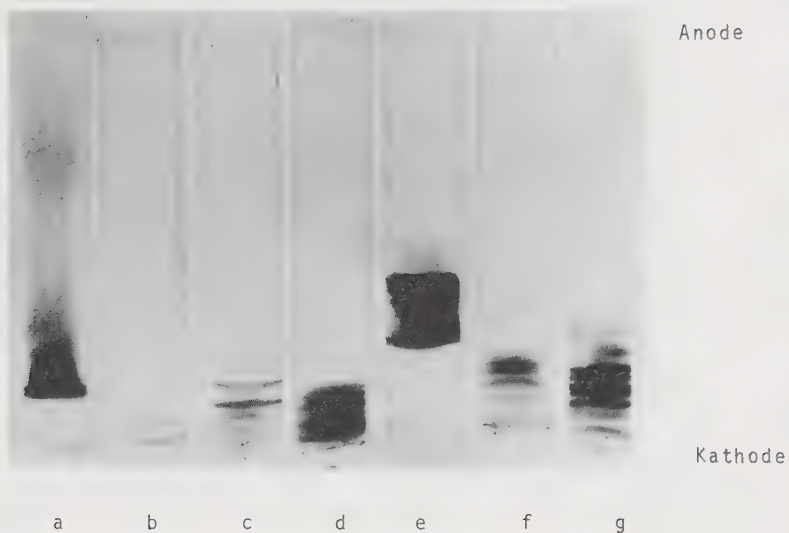


Abb. 25: Isoelektrische Fokussierung: H- und L-Ketten im Vergleich mit Referenzproteinen.

- a) L-Ketten,
- b) H-Ketten,
- c) Albumin,
- d) Aldolase,
- e) Chymotrypsinogen,
- f) Catalase,
- g) Ovalbumin.

und Ig G ermittelten IEP's der Myelom-L-Ketten (Abb. 26), die nach dem dazu ermittelten pH-Gradientenbild der Abb. 27 ermittelt wurden.

Tabelle 3

IEP	Versuch		Literatur	
L-Ketten	5,1 - 8,8		4,5 - 8,5	(85)
			5,0 - 8,2	(36)
H-Ketten	7,2 - 8,5		6,5 - 9,0	(85)
Immunglobulin G	5,2 - 8,5		6,3 - 9,0	(61)
			5,1 - 8,9	(61)
			5,6 - 9,6	(85)
Myelom-L-Ketten	Ba.	Be.	Mo.	Lö.
IEP :	5,3-6,0	5,4-7,7	5,4-8,3	5,4-7,9

Damit bewegen sich die IEP's der Myelom-L-Ketten im Bereich der IEP's normaler L-Ketten, sie erfassen nur jeweils einen kleineren Teil des Spektrums.

E) Isoelektrische Fokussierung mit der LKB-Säule

Die isoelektrische Fokussierung von L-Ketten ist in ihrem Ergebnis in Abb. 28 dargestellt. Nach Beendigung des Laufes wurde im auslaufenden Säuleninhalt (Ordinate) kontinuierlich der pH-Wert und die Eiweißkonzentration bestimmt (Abszisse). Es wurden Fraktionen von 5 ml geschnitten und fortlaufend nummeriert.

Von den Fraktionen 8 bis 12, d.h. vom 35. bis 60. ml des Eluats konnten nach nochmaliger diskoelektrophoretischer Fokussierung - wie oben in der Methodik beschrieben - die Bilder der Abb. 29 gewonnen werden.

Wurden Gele nach gleicher Vorbereitung einmal gefärbt und zum anderen immunologisch untersucht, ergaben sich Immunpräzipitate mit anti-L und anti-L Antiseren in den Fraktionen 8 bis 11.

F) Immunologische Geluntersuchungen

Bei den immunologischen Geluntersuchungen von L-Ketten nach der oben beschriebenen Scheibchentechnik konnten in den Bereichen, in denen die vergleichbaren gefärbten Gele Banden aufwiesen, für Gele in der SDS- und in der isoelektrischen Fokussierung Immunpräzipitate sowohl mit anti-L_K als auch anti-L_λ Antiseren nachgewiesen werden.

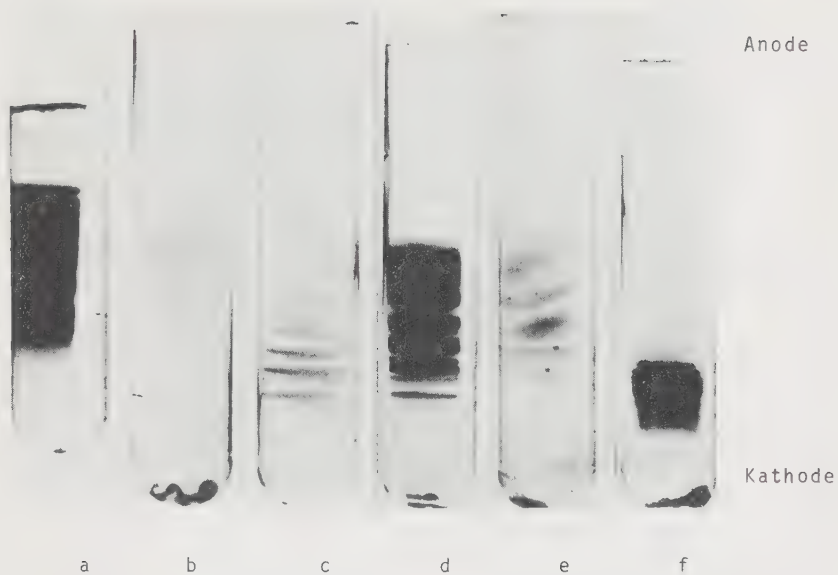


Abb. 26: Isoelektrische Fokussierung: normale L-Ketten im Vergleich mit Myelom-L-Ketten und Ig G.

a) normale L-Ketten,

b) - e) Myelom-L-Ketten,

f) Ig G.

b) Ba., c) Be., d) Mo. und e) Lö.

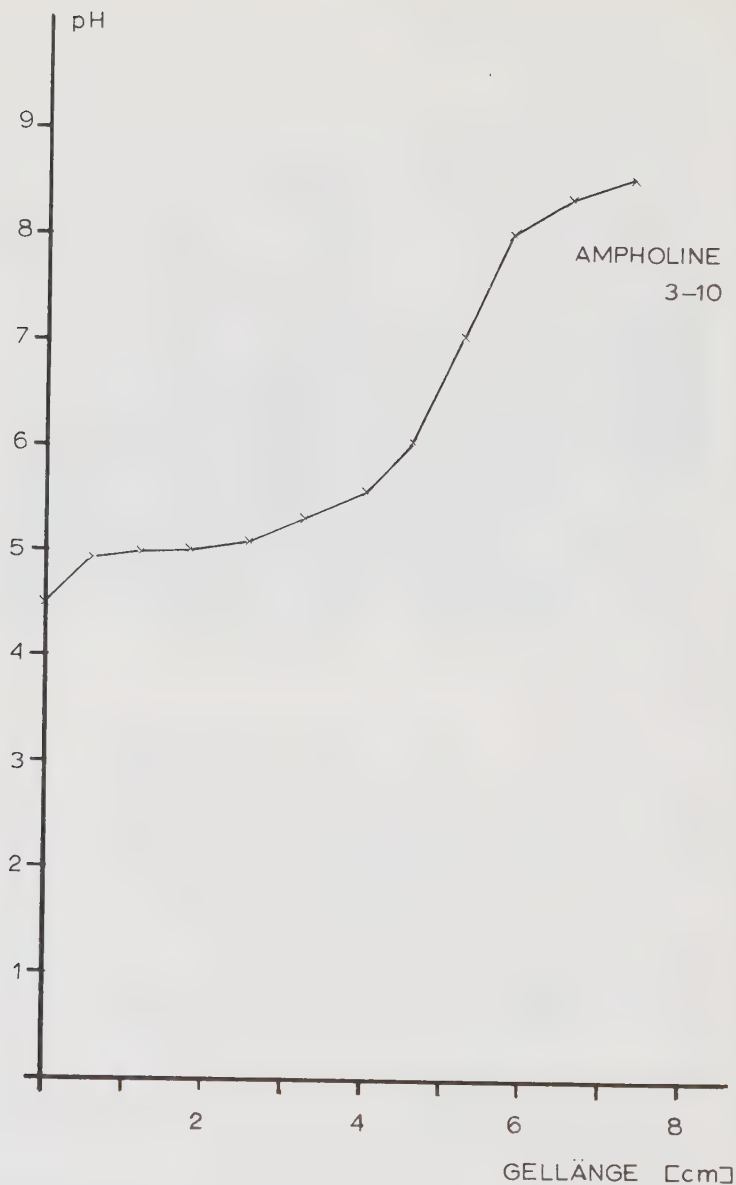


Abb. 27: Isoelektrische Fokussierung: pH-Wertverlauf in Abhängigkeit von der Gellänge. pH-Bereich 3 - 10.
Anode am oberen Gelpol.

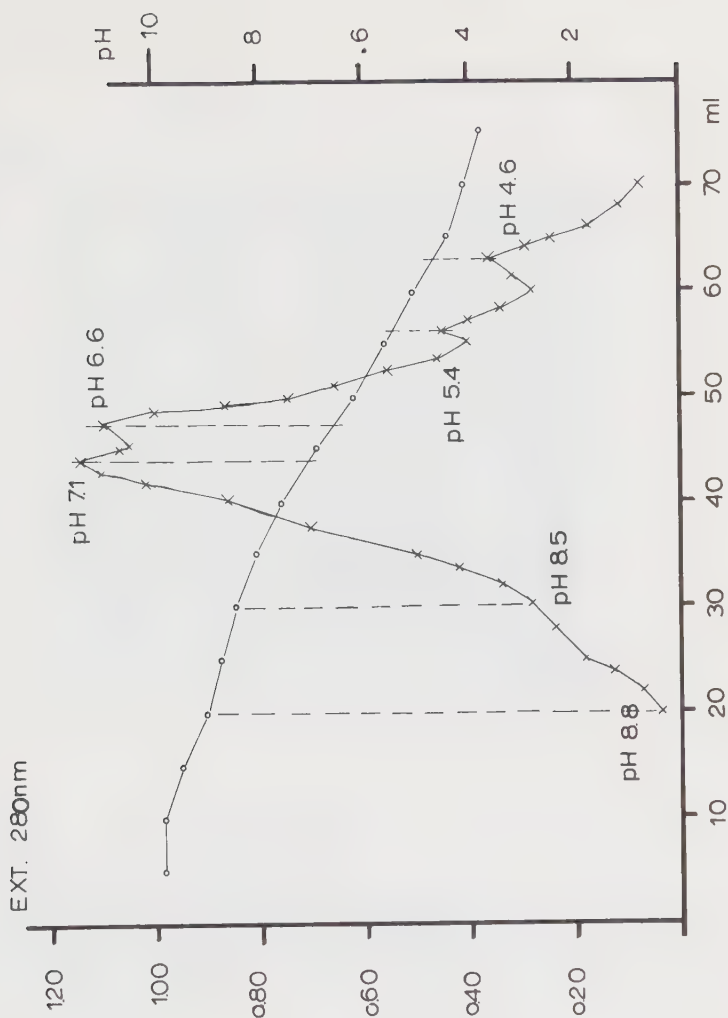


Abb. 28: Isoelektrische Fokussierung: L-Ketten im Lauf über die LKB-Säule.

o - o - o - pH-Wertverlauf

x - x - x - Eiweißextinktionskurve bei 280 nm im Eluat.

Für einige charakteristischen Kurvenpunkte sind die zugehörigen pH-Werte eingetragen.

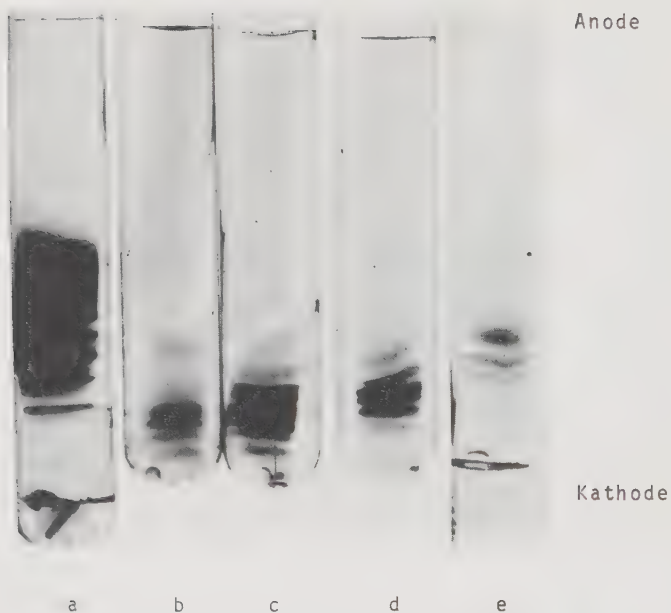


Abb. 29: Isoelektrische Fokussierung: Fokussierung einzelner Eluatfraktionen des L-Ketten - LKB-Laufes. Schneiden und Nummerieren der Fraktionen siehe Text.

- a) Fraktion 8,
- b) Fraktion 9,
- c) Fraktion 10,
- d) Fraktion 11,
- e) Fraktion 12.

Diskussion

I) Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Seit den Untersuchungen von SMITHIES (93), der die Elektrophorese mit Kartoffelstärke als Trennmedium einführte und besonders den Arbeiten von RAYMOND und WEINTRAUB (84) 1959, sowie DAVIS (19) und ORNSTEIN (68), die den vollsynthetischen Kunststoff Polyacrylamid für diesen Zweck nutzbar machten und die Trennung in senkrecht angebrachten Glasröhrchen vorschlugen, wurden zahlreiche Substanzen mit dieser Methode untersucht. Das Interesse konzentrierte sich u. a. auf die Serumproteine. So wurden bei der Untersuchung von L-Ketten von Ig G von COHEN und PORTER (16) etwa 10 verschiedene Banden im Stärkegel gefunden. Dieser Befund konnte im Polyacrylamidgel mit 7 bis 8 Banden bestätigt werden (REISFELD und SMALL, 87; REISFELD, 86; PRELLWITZ, HAMMAR al. 79, PRELLWITZ, OPFERKUCH al. 80).

Mit der vorliegenden Arbeit können diese früheren Befunde für normale L-Ketten bestätigt werden. Jedoch zeigen auch die untersuchten Myelom-L-Ketten in der Diskelektrophorese eine ausgesprochene Heterogenität. So sind bei den L-Ketten Ba. ebenso viele Banden wie bei normalen L-Ketten zu erkennen, jedoch um eine Bandenbreite kathodenwärts verschoben. Be. läßt fünf, Mo. drei und Lö. wieder vier Banden erkennen.

Nun sind aufgrund ihrer monoklonalen Genese Myelom-L-Ketten von Natur aus zunächst homogen. Homogene Befunde sind daher in der Polyacrylamidelektrophorese wiederholt beschrieben (15, 37, 81). Aber auch das Auftreten mehrerer Banden ist dokumentiert (71, 79, 97). Erklärungsmöglichkeiten werden mit der Diskussion der isoelektrischen Fokussierung besprochen.

II) SDS-Diskelektrophorese

Auch in dieser Arbeit kann bestätigt werden, daß die Methode von SHAPIRO al. (91) zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen sehr gut geeignet ist. Das Molekulargewicht der H- und L-Ketten kann im Einklang mit den Literaturwerten mit ca. 50.000 und 23.000 bestimmt werden, das der Myelom-L-Ketten liegt zwischen 21.000 und 25.000.

Bei den Versuchen tritt jedoch eine starke Neigung zur Polymerisation auf. Sie ist bei L-Ketten bekannt; in reiner Form treten sie zum größten Teil als Di-, Tetra- und Polymere auf (8). Ebenso ist

Albumin als Polymerenbildner bekannt. Aber auch bei den übrigen untersuchten Proteinen mit Ausnahme der Catalase treten diese Di-, Tri-, Tetra- und Polymeren auf.

SHAPIRO al. (91) empfehlen in solchen Fällen, die sie vereinzelt beobachteten, die Carboxymethylierung der Substrate.

Die Di- und Polymerisation bei L-Ketten erfolgt allerdings über kovalente S-S-Brücken und nicht kovalente Bindungen (z.B. H-Brückenbildung, Brücken zwischen aromatischen Aminosäuren u.ä.).

Die Alkylierung ist für L-Ketten besser geeignet als die Carboxymethylierung (41), um SH-Reste, die vorher durch Reduktion freigelegt wurden, zu verschließen.

Obwohl dieses Verfahren in den angeführten Versuchen in den verschiedensten Varianten durchgeführt wird, läßt sich eine Polymerisation der L-Ketten nicht vermeiden. Nicht kovalente Bindungen können in dem stark dissozzierenden Medium, 8 m Urea, auch nicht zur Erklärung herangezogen werden.

Es scheint, daß andere Autoren (20, 108), die von der erfolgreichen Anwendung der SHAPIROschen Methode berichten, keine derartigen Polymerisierungen beobachteten. Wie am angeführten Experiment ersichtlich, treten allerdings Di- und Polymerisation erst bei höheren Eiweißkonzentrationen von 50 ^µmg aufwärts in Erscheinung. Die Vermutung liegt nahe, daß die Polymerenbanden bei kleineren Proteinkonzentrationen keine so große Dichte haben, um sichtbar zu werden. Um Fehler bei der Probenzubereitung auszuschalten, werden jeweils 20 mg L-Ketten nach SDS-Vorschrift zubereitet und anschließend mit dem 1:1 verdünnten SDS-Gelpuffer an Chromatographiersäulen mit Sephadex G 15 bis G 100 rechromatographiert, um zu überprüfen, ob die Ketten ein einheitliches Molekulargewicht haben. Spektralphotometrisch ist im Eluat immer nur ein Gipfel nachzuweisen, also nur ein Protein mit einheitlichem MG vorhanden. Dieses MG kann mit Hilfe der Säulenvolumina und Laufwerte mit ca. 25.000 bestimmt werden.

Die Befunde der Säulenläufe schließen eine Polymerenbildung nicht aus, da im Rahmen der Meßgenauigkeit des Photometers durchaus kleinere Eiweißkonzentrationen im Eluat übersehen werden können, die bei der viel empfindlicheren Diskelektrophorese imponieren.

III) Isoelektrische Fokussierung

1961/62 entwickelte SVENSSON in seinen grundlegenden Arbeiten (94,

95) über die isoelektrische Trennung, Analyse und Charakterisierung von Ampholyten in natürlichen pH-Gradienten ein System, um aus niedermolekularen Peptiden und Aminosäuren im elektrischen Feld einen pH-Gradienten aufzubauen. In diesem natürlichen pH-Gradienten können Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (IEP) aufgetrennt werden. VESTERBERG und SVENSSON (105) schufen auch die apparativen Grundlagen hierfür. Bei den beträchtlichen Anschaffungskosten bot sich die Suche nach einfacheren Trenngeräten an. Unabhängig voneinander entwickelten AWDEH, WILLIAMSON und ASKONAS (5), DALE und LATNER (17, 18), FAWCETT (31), LEABACK und RUTTER (60, 61), RILEY und COLEMAN (88) und WRIGLEY (111, 112) die Anwendung der Trägerampholyten im Polyacrylamidgel.

In dieser Arbeit werden L-Ketten mittels der diskelektrophoretischen Technik nach WRIGLEY (112) elektrofokussiert und orientierend mit einer entsprechenden, im trägerfreien Medium (Saccharosegradienten) fokussierten Probe und mit Myelom-L-Ketten verglichen.

Wichtigstes Ergebnis ist, daß die isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidgel eine weitgehendere Auftrennung der L-Ketten als bisher ermöglicht. Bei den vorliegenden Versuchen können bei normalen L-Ketten im pH-Bereich 3 - 10 16 Banden festgestellt werden. Diese im herkömmlichen Polyacrylamidgel ohne Ampholine nicht erreichte Trennschärfe erklärt sich aus der Möglichkeit, Proteine, die im IEP um 0,01 - 0,02 pH-Einheiten differieren, in der isoelektrischen Fokussierung scharf voneinander zu trennen (103, 104).

Normales Immunglobulin G weist 13, H-Ketten 7 Banden auf. Bei Albumin können 4 - 5, bei Aldolase 4, bei Chymotrypsinogen 7, bei Catalase 1 und bei Ovalbumin 3 Banden festgestellt werden. Die isoelektrischen Punkte sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

In einem Fall kann die Gelelektrophokussierung mit einem LKB-Säulenlauf verglichen werden. Es ergibt sich in Bezug auf die Ermittlung der IEP's der L-Ketten gute Übereinstimmung. In der Abbildung des Laufes (Abb. 28) kann man hauptsächlich einen Gipfel erkennen, die Vielfalt der Banden im Gel zeichnet sich nicht ab. Das ist darauf zurückzuführen, daß der pH-Gradient steil von pH 8 auf pH 6 abfällt und so die aufgetragene L-Ketten-Probe nicht weiter aufgetrennt werden kann.

Eine nochmalige Auftrennung der aus dem Säulenlauf gewonnenen Fraktionen in der Diskelektrophorese beweist, daß die so erzielte Tren-

nung noch sehr grob ist.

Eine feinere Auftrennung der L-Ketten mit Hilfe der LKB-Säule muß späteren Versuchsreihen vorbehalten bleiben. Prinzipiell ist die gute Vergleichbarkeit von isoelektrischer Fokussierung mit der Diskelektrophorese und im trägerfreien Saccharosemedium jedenfalls nachgewiesen.

Mit der hier verwandten Säule sind bereits von anderen Autoren Fraktionierungen von L-Ketten durchgeführt worden. Dabei fanden REIS, WETTER und HAKE (85) eine Kurve mit 5 Peaks im pH-Bereich zwischen 6,5 und 8,6 für die L-Ketten Ku. Eine Auftrennung von L-Ketten in 10 bis 12 Peaks legten GERBER und BARADUN (36) vor. Diese würde den hier gezeigten Bildern der Diskelektrophorese schon in etwa entsprechen.

Die untersuchten Myelom-L-Ketten liegen mit ihren IEP's in dem vom L-Ketten-Pool bestimmten Rahmen. Jedoch ist das Verhalten der Myelom-L-Ketten in der "normalen" und der isoelektrischen Fokussierung durchaus verschieden. Während das Protein Ba. in der "normalen" Diskelektrophorese Pool-L-Ketten fast gleicht, weist es in der isoelektrischen Fokussierung nur 4 Banden auf. Auch die Myelom-L-Ketten Be. (7 Banden), Mo. (10 Banden) und Lö. (3 Banden) unterscheiden sich von normalen L-Ketten und untereinander.

Die Anzahl der Banden in der isoelektrischen Fokussierung hängt also von der Normalelektrophorese nicht ab.

Um zu versuchen, das grundsätzlich verschiedene Bild, das normale L-Ketten sowie Myelom-L-Ketten in der Polyacrylamid-Diskelektrophorese und in der isoelektrischen Fokussierung zeigen, zu deuten, soll zunächst auf die Heterogenität der Myelom-L-Ketten eingegangen werden.

Von Mäuseplasmocytomen ist bekannt, daß sie heterogen in der Diskelektrophorese sein können. FAHEY (29) und ASKONAS (2) haben schon 1961 an Mäuseplasmocytomen verschiedene Möglichkeiten der Ig G-Bandenbildung in der Diskelektrophorese gezeigt. FAHEY (30) unterscheidet so 1963 eine Art der Polymerenbildung bei Ig A (das Bild sieht dann so wie die Polymerenbildung von L-Ketten bei der SDS-Diskelektrophorese aus) und eine "elektrophoretische" Heterogenität, die der hier beschriebenen gleicht.

1958 wiesen OWEN al. (71) beim humanen Ig G bis zu fünf und TERRY al. (97) 1966 im Polyacrylamidgel bis zu 8 Banden von Myelom-L-Ket-

ten nach, die so bisweilen von normalen L-Ketten nicht zu unterscheiden waren. PRELLWITZ ^{al.} bestätigten diese Befunde (78, 79).

1966 setzte sich erstmals FEINSTEIN mit den multiplen und regelmäßigen Banden der L-Ketten auseinander. Es gelang ihm (32), nachzuweisen, daß sich die einzelnen Banden jeweils um eine Ladungseinheit, d.h. eine geladene Gruppe unterscheiden, sozusagen L-Ketten-Quanten darstellen. Methodisch ging FEINSTEIN so vor, daß er die Ladung von Myelom-L-Ketten mit einer oder zwei freien SH-Gruppen durch Carboxymethylierung mit Jodacetamid um ein oder zwei Einheiten veränderte, um dann das elektrophoretische Verhalten zu untersuchen.

COHEN (15) konnte diese Befunde ausdrücklich bestätigen. Damit ist zwar die Heterogenität der L-Ketten prinzipiell verständlich, aber noch ist nicht das Verhalten der Myelom-L-Ketten geklärt.

Ausführliche Befunde von AWDEH, ASKONAS und WILLIAMSON (4) von 1967 zeigen nun, daß frisch sezerniertes Mäuseplasmocytomprotein nur eine Bande aufweist, nach einiger Zeit im Serum jedoch fünf nachweisbar sind.

Bereits während der Sezernierung des Plasmocytomproteins wird dieses aus seiner ursprünglichen Form über eine Intermediärform in die dann im Blut vorliegende Basisform umgewandelt (6). Diese Basisform setzt sich - in Kontakt mit Serum schnell, sonst langsam - in ein Gleichgewicht mit vier weiteren Formen und zwar in absteigender Konzentration. Das endgültige Bild sieht ebenso aus wie fünf Banden von normalen L-Ketten. Eine Abspaltung labiler Amidgruppen, die jeweils zur Veränderung der Gesamtladung um eine Einheit führt, scheint wahrscheinlich (6).

Für solch eine Zunahme sprechen auch die Befunde REISFELDS (86), der zeigte, daß die stärker geladenen Banden der L-Ketten einen geringeren Amidanteil haben. REISFELD isolierte alle Banden einzeln und wies auch nach, daß sie sich in der Aminosäurezusammensetzung nicht gleichen.

Ein ähnlicher Fall von elektrophoretischer Heterogenität aufgrund des Verlustes labiler Amidgruppen ist am Beispiel des Pottwalmyoglobins ausführlich (25, 26) dokumentiert.

Eine Erklärung der Heterogenität der L-Ketten von Normalpersonen und Patienten mit Myelom ist außerordentlich schwierig.

Zwar ist nicht sicher, ob die oben genannten Befunde an Mäuseplas-

mocytomen auch auf humane Myelom-L-Ketten anzuwenden sind, doch erscheint es wahrscheinlich, daß auch hier die Heterogenität der ursprünglich monoclonalen L-Ketten als Umbauvorgänge oder vielleicht auch als Alterung zu deuten sind.

Bei der Betrachtung normaler L-Ketten und von Myelom-L-Ketten fällt auf, daß sich die Bilder der Polyacrylamidelektrophorese und der isoelektrischen Fokussierung wesentlich unterscheiden.

In der Polyacrylamidelektrophorese sind ca. 8 Banden zu erkennen. Ganz eindeutig sind die mittleren die am stärksten ausgeprägten, die Intensität der Banden geht zur Anode und Kathode hin zurück, es scheint etwa eine symmetrische Verteilung im Sinne einer Gauß-Kurve vorzuliegen.

Der Abstand zwischen zwei Banden beträgt eine Ladungseinheit (32). Daraus folgt, daß L-Ketten meist mit einer bestimmten Anzahl von Ladungen, z.B. "n" Ladungen, vorliegen. Am nächst häufigsten kommen Ketten mit $n + 1$ bzw. $n - 1$ Ladungen vor usw.

Es erscheint wahrscheinlich, daß die Grundlage dafür ein Fließgleichgewicht zwischen verschiedenen möglichen Formen von L-Ketten ist, wie sie im Serum durch Abspaltung von geladenen Gruppen (etwa Spaltung von Säureamidgruppen aus Glutamin und Asparagin) ineinander übergehen.

Die Banden von Myelom-L-Ketten können durchaus über das Bandenspektrum normaler L-Ketten hinausreichen, wenn man davon ausgeht, daß bestimmte Myelom-L-Ketten schon in ihrer Ausgangsform im Randbereich normaler L-Ketten angesiedelt sind und nun durch Umwandlung in andere Formen ganz außerhalb des normalen Spektrums gelangen. Dies kann nun sichtbar werden, da die Myelom-L-Kette rein und konzentriert vorliegt und so ihre Umwandlungsstufen genügend Substanz darstellen. Während so für die Polyacrylamidgelelektrophorese nur die Summe aller Ladungen der L-Ketten eine Rolle spielt - und diese Summe scheint um einen Mittelwert nur um $+3$ bis $+4$ stets ganze Einheiten zu schwanken, wobei stärkere Schwankungen aus Gründen zu niedriger Konzentration in der Regel nicht erkannt werden -, so spielen bei der isoelektrischen Fokussierung alle geladenen Aminosäuren eine individuellere Rolle.

Zwei L-Ketten, die die gleiche Summenladung tragen, können sich so sehr wohl in ihrem IEP unterscheiden.

Damit würde das nicht mehr so gleichmäßige Verteilungsbild der L-

Ketten-Banden verständlich. Für den IEP gibt es keinen in diesem Sinne bevorzugten Mittelwert, obzwar sich bei einzelnen Punkten Schwerpunkte zeigen. Die IEP's der Myelom-L-Ketten fügen sich ohne weiteres in die gesamte Bandbreite der IEP normaler L-Ketten ein.

So erscheint es zur Untersuchung und Charakterisierung von L-Ketten schließlich sinnvoll, die isoelektrische Fokussierung der Polyacrylamidgelelektrophorese ohne Trägerampholyte vorzuziehen. Die isoelektrische Fokussierung vermag eine bessere Aussage über das Ladungsverhalten einer L-Ketten-Gruppe oder einer Myelom-L-Kette zu geben.

Man sollte daher die Anregung von REIS, WETTER und HAKE (85), ein Ig G künftig mit seinem IEP als Index zu bezeichnen, ohne weiteres auch auf L-Ketten ausdehnen.

Für die morphologisch orientierende Untersuchung scheint die isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidgel der entsprechenden Säulentrennung überlegen, da sie technisch und apparativ einfach, gut reproduzierbar und nicht aufwendig ist. Zur Reinheitsprüfung einer Substanz ist sie dank großer Trennschärfe und Informationsvielfalt sehr gut geeignet. Abschließend sei aber hinzugefügt, daß auch mit der isoelektrischen Fokussierung die Trennung von L-Ketten in κ - und λ -Formen nicht möglich war. Ob mit dieser Methode spezifische Antikörper voneinander getrennt werden können, muß bezweifelt werden.

Zusammenfassung

Zunächst wird eine Übersicht über die derzeitigen Vorstellungen vom Aufbau eines Antikörpers gegeben.

Nach der immunologischen Reinheitsprüfung und Typisierung können in der "normalen" Diskelektrophorese bei normalen L-Ketten 8 Banden und bei den Plasmocytom-L-Ketten 3 bis 7 Banden festgestellt werden.

In der SDS-Diskelektrophorese wird das Molekulargewicht der H-Ketten mit ca. 50.000, das normaler L-Ketten mit 23.000 bestimmt. Die Molekulargewichte der vier Plasmocytom-L-Ketten bewegen sich zwischen 21.000 und 25.000. Bei H-Ketten und normalen L-Ketten wird wie bei Referenzproteinen Polymerenbildung beobachtet.

Normale H- und L-Ketten, Myelom-L-Ketten, Ig G und einige Referenzproteine werden mit Trägerampholyten isoelektrisch fokussiert.

Bei der isoelektrischen Fokussierung im Polyacrylamidgel zeigen normale L-Ketten 16 Banden, die Myelom-L-Ketten eine geringere Bandenzahl. Der IEP von normalen L-Ketten wird mit 5,1 - 8,8 von H-Ketten mit 7,2 - 8,5 bestimmt. Die IEP's der Myelom-L-Ketten bewegen sich zwischen 5,3 und 7,9.

Es wird versucht, die Heterogenität der L-Ketten und der Plasmocytom-L-Ketten und ihre unterschiedliche Bandenbildung in der Polyacrylamiddiskelektrophorese und der isoelektrischen Fokussierung im gleichen Medium neu zu deuten.

Literaturverzeichnis

- 1) APPELLA, E. und D. EIN: Two types of lambda polypeptide chains in human immunoglobulins based on a amino acid substitution at position 190. Proc. nat. Acad. Sci. USA 57, S.1449-1454, 1967.
- 2) ASKONAS, B.A.: A study on globulin formation by plasma-cell neoplasm 5563 transplantable in mice. Biochem. J. 79, S.33-43, 1961.
- 3) AWDEH, Z.L.: Staining method for proteins after isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Science Tools 16, S.42-43, 1969.
- 4) AWDEH, Z.L., ASKONAS, B.A. und A.R. WILLIAMSON: The homogeneous γ -G immunoglobulin produced by mouse plasmocytoma 5563 and its subsequent heterogeneity in serum. Biochem. J. 102, S. 548 - 553, 1967.
- 5) AWDEH, Z.L., WILLIAMSON, A.R. und B.A. ASKONAS: Isoelectric focusing in polyacrylamide gel and its application to immunoglobulins. Nature 219, S. 66-67, 1968.
- 6) AWDEH, Z.L., WILLIAMSON, A.R. und B.A. ASKONAS: One cell - one immunoglobulin. Origin of limited heterogeneity of myeloma proteins. Biochem. J. 116, S. 241 - 248, 1970.
- 7) BAGLIONI, C., ALESCIO-ZONTA, L. und D. CIOLI: Allelic antigenetic factor inv (a) of the light chains of human immunoglobulins: chemical basis. Science 152, S. 1517-1519, 1966.
- 8) BERNIER, G.M. und F.W. PUTNAM: Monomer-dimer forms of Bence-Jones proteins. Nature 200, S. 223-225, 1963.
- 9) BREINL, F. und F. HAUROWITZ: Chemische Untersuchung des Präzipitates aus Hämoglobin und Anti-Hämoglobin-Serum und Bemerkungen über die Natur der Antikörper. Hoppe-Seyler's Z. physiol.Chem. 192, S. 45 - 57, 1930.
- 10) Bulletin of the World Health Organisation: Nomenclature for human immunoglobulins. Bull.Wld.Hlth.Org. 30, S.447-450, 1964.
- 11) Bulletin of the World Health Organisation: Notation for genetic factors of human immunoglobulins. Bull. Wld. Hlth. Org. 33, S. 721 - 724, 1965.

- 12) Bulletin of the World Health Organisation: An extension of the nomenclature for immunoglobulins. Bull. Wld. Hlth. Org. 41, S. 975 - 977, 1969.
- 13) BURNET, F.M.: The clonal selection theory of acquired immunity. 1. Aufl., Cambridge, 1959.
- 14) CLELAND, W.W.: Dithiothreitol, a new protective reagent for SH-groups. Biochemistry (Wash.) 3, S. 480 - 482, 1964.
- 15) COHEN, S.: General structure and heterogeneity of immunoglobulins. Proc. Roy. Soc. Ser. B 166, S. 114 - 123, 1967.
- 16) COHEN, S. and R.R. PORTER: Heterogeneity of the peptide chains of γ -globulin. Biochem.J. 90, S. 278-284, 1964.
- 17) DALE, G. und A.L. LATNER: Isoelectric focusing in polyacrylamide gels. Lancet 1, S. 847 - 848, 1968.
- 18) DALE, G. and A.L. LATNER: Isoelectric focusing of serum proteins in polyacrylamide gels followed by electrophoresis. Clin. Chim. Acta 24, S. 61 - 68, 1969.
- 19) DAVIS, B.J.: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. N.Y.Acad.Sci. 121, S. 404-427, 1964.
- 20) DUNKER, A.K. und R.R. RUECKERT: Observations on molecular weight determinations on polyacrylamide gels. J. biol. Chem. 244, S. 5074 - 5080, 1969.
- 21) EDELMAN, G.M.: Dissociation of gamma globulin. J. Amer. chem. Soc. 81, S. 3155-3156, 1959.
- 22) EDELMAN, G.M., CUNNINGHAM, B.A., GALL, W.W., GOTTLIEB, P.D., RUTISHAUSER, V. und M.J. WAXDAL: The covalent structure of an entire γ G immunoglobulin molecule. Proc. nat. Acad. Sci. USA 63, S. 78-85, 1969.
- 23) EDELMAN, G.M. und J.A. GALL: The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal γ -globulins. J.exp.Med. 116, S.207-227, 1962.
- 24) EDELMAN, G.M., und J.A. GALL: A model for the 7 s antibody molecule. Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, S. 846 - 853, 1964.
- 25) EDMUNDSON, A.B.: Amino-acid sequence of sperm whale myoglobin. Nature 205, S. 883-887, 1965.

- 26) EDMUNDSON, A.B. und C.H.W. HIRS: On the structure of sperm whale myoglobin. I. The amino-acid composition and terminal groups of the chromatographically purified proteins. *J. molec. Biol.* 5, S. 663-682, 1962.
- 27) EHRLICH, P.: Croonian lecture: On immunity with special reference to cell life. *Proc. Roy. Soc. London* 66, S. 424-448, 1900.
- 28) EISEN, H.N., LITTLE, J.R., OSTERLAND, C.K. und E.S. SIMMS: A myeloma protein with antibody specificity. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 32, S. 75-82, 1967.
- 29) FAHEY, J.L.: Physicochemical characterization of mouse myeloma proteins: demonstration of heterogeneity for each myeloma globulin. *J. exp. Med.* 114, S. 399-413, 1961.
- 30) FAHEY, J.L.: Heterogeneity of myeloma proteins. *J. clin. Invest.* 42, 1, S. 111-123, 1963.
- 31) FAWCETT, J.S.: Isoelectric fractionation of proteins on polyacrylamide gels. *FEBS Letters* 1, S. 81-82, 1968.
- 32) FEINSTEIN, A.: Use of charged thiol reagents in interpreting the electrophoretic patterns of immunoglobuline chains and fragments. *Nature* 210, S. 135-137, 1966.
- 33) FLATMARK, T. und O. VESTERBERG: On the heterogeneity of beef heart cytochrome C. IV. Isoelectric Fractionation by electrophoresis in a natural pH-gradient. *Acta chem. Scand.* 20, S. 1497-1503, 1966.
- 34) FLEISCHMAN, J.B., PAIN, R.H. und R.R. PORTER: Reduction of γ -globulin. *Arch. Biochem. Suppl.* 1, S. 174-180, 1962.
- 35) FRANKLIN, E.C. und B. FRANGIONE: Structural differences between macroglobulins belonging to two serologically distinguishable subclasses. *Biochemistry (Wash.)* 7, S. 4203-4211, 1968.
- 36) GERBER, H. und S. BARANDUN: Isoelectric separation of urinary Bence-Jones proteins and light chains of human Ig G. *Separation Science* 4, S. 51-67, 1969.
- 37) GRABAR, P., FAUVERT, R., BURTIN, P. und L. HARTMANN: Étude sur les protéines du myélome. II. L'analyse immuno-électrophorétique des sérums de 30 malades. *Rev. franc. Étud. clin. biol.* 1, S. 175-186, 1956.

- 38) GREY, H.M.: Phylogeny of immunoglobulins. *Advances Immun.* 10, S. 51-104, 1969.
- 39) GREY, H.M., ABEL, C.A., YOUNT, W.J. und H.G. KUNKEL: A subclass of human γ -A-globulins (γ -A₂) which lacks the disulfide bonds linking heavy and light chains. *J. exp. Med.* 128, S. 1223-1236, 1968.
- 40) GREY, H.M. und H.G. KUNKEL: H chains subgroups of myeloma proteins and normal 7s γ -globulin. *J. exp. Med.* 120, S. 253-266, 1964.
- 41) GURD, F.R.N.: Carboxymethylation. *Meth.Enzym.* 11, S.532-541, 1967.
- 42) HEREMANS, J.F.: Les globulines sériques du système gamma. 1. Aufl. Brüssel, 1960.
- 43) HESS, M. und N. HILSCHMANN: Genetischer Polymorphismus im konstanten Teil von humanen Immunglobulin-L-Ketten vom λ -Typ. *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chemie* 351, S. 67-73, 1970.
- 44) HESS, M. und N. HILSCHMANN: Genetischer Polymorphismus im konstanten Teil von humanen Immunglobulin-L-Ketten vom λ -Typ. II. *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chemie* 352, S.657-664, 1971.
- 45) HESS, M., HILSCHMANN, N., RIVAT, L., RIVAT, C. und C. ROPARTZ: Isotypes in human immunoglobulin λ -chains. *Nature New Biology* 234, S. 58-61, 1971.
- 46) HESS, M., PONSTINGL, H. und N. HILSCHMANN: Zur Strukturregel der Antikörper. Die Primärstruktur einer monoklonalen Immunglobulin-L-Kette vom λ -Typ, Subgruppe IV (Bence-Jones-Protein-Kern). III. Die chymotryptischen Peptide. IV. Die peptidischen Peptide. *Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem.* 352, S. 214-246, 1971.
- 47) HILL, R.L., DELANEY, R., FELLOWS, R.E.jr. und H.E.LEBOWITZ: The evolutionary origins of the immunoglobulins. *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 56, S. 1762-1769, 1966.
- 48) HILL, R.L., LEBOVITZ, H.E., FELLOWS, R.E.jr. und R. DELANEY: The evolution of immunoglobulins as reflected by the amino acid sequence studies of rabbit F_c fragment. *Nobel Symp.* 3, S. 109-127, 1967.

- 49) HILSCHMANN, N.: Die chemische Struktur von zwei Bence-Jones-Proteinen (Roy und Cum) vom κ -Typ. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 348, S. 1077-1080, 1967.
- 50) HILSCHMANN, N.: The structure of the immunoglobulins (L-chains) and the antibody problem. Nobel Symp. 3, S. 33-44, 1967.
- 51) HILSCHMANN, N., BARNIKOL, H.V., HESS, M., LANGER, B., PONSTINGL, H., STEINMETZ-KAYNE, M., SUTER, L. und S. WATANABE: Structure and formation of antibodies. in: Current problems in immunology, hrsg. von WESTPHAL, O., BOCH, H.E. und E. GRUNDMANN, 1. Aufl. Berlin, S. 69-89, 1969.
- 52) HILSCHMANN, N. und L.C. CRAIG: Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins. Proc. nat. Acad. Sci. USA 53, S. 1403-1409, 1965.
- 53) HILSCHMANN, N., PONSTINGL, H., BACZKO, K. BRAUN, D., HESS, M., SUTER, L., BARNIKOL, H.V. und S. WATANABE: The genetic control of antibody variability. Prot. Biol. Fluids 17th Coll., S. 53-61, 1970.
- 54) JONES, H.B.: III. On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. Philos. Trans. Roy. Soc. 138, S. 55-62, 1848.
- 55) JOUSTRA, M. und H. LUNDGREN: Preparation of freeze-dried, monomeric, and immunochemically pure Ig G by a rapid and reproducible chromatographic technique. Prot. Biol. Fluids 17th Coll., S. 511-515, 1970.
- 56) KALCKAR, H.M.: Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III. Studies on the enzymes of purine metabolism. J. biol. Chem. 167, S. 461-475, 1947.
- 57) KLINMAN, N.R., ROCKEY, J.H., FRAUENBERGER, G. und F. KARUSH: Equine anti-hapten antibody. III. The comparative properties of γ -G and γ -A-antibodies. J. Immunol. 96, S. 587-595, 1966.
- 58) KUNKEL, H.G. und R.A. PRENDERGAST: Subgroups of A immunoglobulin. Proc. Soc. exp. Biol. 122, S. 910-913, 1966.
- 59) KUNKEL, H.G. und R.A. PRENDERGAST: Subgroups of gamma-A-immunoglobulin: detection by precipitin analysis. Science 154, S. 1041-1043, 1966.

- 60) LEABACK, D.H. und A.C. RUTTER: Polyacrylamide-isoelectric focusing: a new technique for the electrophoresis of proteins. Biochem. biophys. Res.Comm. 32, S. 447-453, 1968.
- 61) LEABACK, D.H., RUTTER, A.C. und P.G. WALKER: Some application of gel electrofocusing to the separation and characterization of proteins. Prot.biol.Fluids 17th Coll., S.423-426, 1970.
- 62) LI, Y.-T. und S.-C. LI: The application of electrofocusing to the fractionation of proteins. Prot. biol. Fluids 17th Coll. S. 455-463, 1970.
- 63) MAKELÄ, O.: The specificities of antibodies produced by single cells. Cold Spr.Harb.Symp.quant.Biol.32, S.423-430, 1967.
- 64) MAURER, H.R.: Disk-Elektrophorese, 1.Aufl., Berlin, S.66, 1968.
- 65) NATVIG, J.B., KUNKEL, H.G. und T. GEDDE-DAHL jr.: Genetic studies of the heavy chain subgroups of γ G globuline. Recombination between the closely linked cistrons. Nobel Symp. 3, S. 313-328, 1967.
- 66) NATVIG, J.B., KUNKEL, H.G. und S.P. LITWIN: Genetic markers of the heavy chain subgroups of human gamma G globulin. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 32, S. 123-180, 1967.
- 67) NOELCKEN, M.E., NELSON, C.A., BUCKLEY, L.E. III. und C. TANKFORD: Gross conformation of rabbit 7s-immunoglobulin and its papain-cleaved fragments. J.biol.Chem.240, S.218-224, 1968.
- 68) ORNSTEIN, C.: Disc electrophoresis. - I. Background and theory. Ann.N.Y.Acad. Sci. 121, S. 321-349, 1964.
- 69) OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Prog.Allergy 5, S. 1-78, 1958.
- 70) OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. Prog. Allergy 6, S. 30-154, 1962.
- 71) OWEN, J.A., GOT, C. und H.G. SILBERMAN: Heterogeneity of serum myeloma globulins. Clin.Chim.Acta 3, S.605-607, 1958.
- 72) PAULING, L.: A theory of the structure and process of formation of antibodies. J. Am. chem. Soc. 62, S. 2643-2657, 1940.
- 73) PONSTINGL, H., BRAUN, H.G., HESS, M. und N. HILSCHMANN: Zur

Strukturregel der Antikörper. Die Primärstruktur einer monoklonalen Immunglobulin-L-Kette vom λ -Typ, Subgruppe IV (Bence-Jones-Protein Kern). I. Reinigung und Charakterisierung. II. Die tryptischen Peptide. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, S. 195-213, 1971.

- 74) PONSTINGL, H., HESS, M. und N. HILSCHMANN: Die vollständige Aminosäure-Sequenz des Bence-Jones-Protein Kern. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 349, S. 867-871, 1968.
- 75) PONSTINGL, H., HESS, M. und N. HILSCHMANN: Zur Strukturregel der Antikörper. Die Primärstruktur einer monoklonalen Immunglobulin-L-Kette vom λ -Typ, Subgruppe IV. V. Die vollständige Aminosäuresequenz und ihre genetische Interpretation. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352, S. 247-266, 1971.
- 76) PONSTINGL, H. und N. HILSCHMANN: Vollständige Aminosäuresequenz einer λ -Kette der Subgruppe II (Bence-Jones-Protein VII). Die Evolution als Ursache der Antikörperspezifität. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, S. 1148-1152, 1969.
- 77) PORTER, R.R.: The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. Biochem. J. 73, S. 119-126, 1959.
- 78) PRELLWITZ, W. und C.-H. HAMMAR: Chromatographische, sedimentationsanalytische, immunologische und stärkegelelektrophoretische Untersuchungen an Paraproteinen. Klin. Wschr. 44, S. 989-998, 1966.
- 79) PRELLWITZ, W., HAMMAR, C.-H., OPFERKUCH, W. und E. KÖTTGEN: Untersuchungen an L-Ketten von gamma-G-Globulinen bei Gesunden und Patienten mit Plasmocytom und Lebercirrhose. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 74, S. 509-512, 1968.
- 80) PRELLWITZ, W., OPFERKUCH, W., HAMMAR, C.-H. und E. KÖTTGEN: Concerning the substructure of the immunoglobulins. Preparation and characterization of H- und L-chains of the γ G- and γ A-globulins of normal human sera. Clin. Chim. Acta 20, S. 505-515, 1968.
- 81) PUTNAM, F.W.: Aberration of protein metabolism in multiple myeloma. Interrelationships of abnormal serum globulins and Bence-Jones proteins. Physiol. Rev. 37, S. 512-537, 1957.
- 82) PUTNAM, F.W., SHINODA, T., TITANI, K. und M. WIKLER: Immunoglo-

bulin structure: Variation in amino acid sequence and length of human lambda light chains.

Science 157, S. 1050-1053, 1967.

- 83) PUTNAM, F.W., TITANI, K. und E. WHITLEY jr.: Chemical structure of light chains: amino acid sequence of type K Bence-Jones proteins. Proc. Roy. Soc. Ser. B 166, S. 124-137, 1967.
- 84) RAYMOND, S. und L. WEINTRAUB: Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. Science 130, S. 711, 1959.
- 85) REIS, H.E., WETTER, O. und Th. HAKE: Zur Polypeptidkettenstruktur von Immunglobulinen. II. Ergebnisse der isoelektrischen Trennung von normalen und Myelom-Ig G-Globulinen sowie ihrer Polypeptidketten. Klin.Wschr. 48, S. 862-866, 1970.
- 86) REISFELD, R.A.: Heterogeneity of rabbit light polypeptide chains. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 32, S. 291-298, 1967.
- 87) REISFELD, R.A. und P.A. SMALL jr.: Electrophoretic heterogeneity of polypeptide chains of specific antibodies. Science 152, S. 1253-1255, 1966.
- 88) RILEY, R.F. und M.K. COLEMAN: Isoelectric fractionation of proteins on a microscale in polyacrylamide and agarose matrices. J. Lab. clin. Med. 72, S. 714-720, 1968.
- 89) ROCKEY, J.H., KLINMAN, N.R. und F. KARUSH: Equine antihapten antibody. I. 7s β_2A^- and los γ_1 -globulin compounds of purified anti- β -lactoside antibody. J. exp. Med. 120, S. 589-609, 1964.
- 90) SCHEIDEGGER, J.J.: Une micro-méthode de l'immunélectrophorèse. Int. Arch. Allergy 7, S. 103-110, 1955.
- 91) SHAPIRO, A.L., VIÑUELA, E. und J.V. MAIZEL: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. biophys. Res. Comm. 28, S. 815-820, 1967.
- 92) SMITH, G.P., HOOD, L. und W.M. FITCH: Antibody diversity. Ann. Rev. Biochem. 40, S. 969-1012, 1971.
- 93) SMITHIES, O.: Zone electrophoresis in starch gels and its application to studies of serum proteins. Advances Protein Chem. 14, S. 65-113, 1959.

- 94) SVENSSON, H.: III. Description of apparatus for electrolysis in columns stabilized by density gradients and direct determination of isoelectric points. Arch. Biochem. Suppl. 1, S. 132-138, 1962.
- 95) SVENSSON, H. und S. PETTERSSON: A simple device of making a constant density gradient. Separation Science 3, S. 209-234, 1968.
- 96) TERRY, W.D., MATTHEWS, B.W. und D.R. DAVIES: Crystallographic studies of a human immunoglobulin. Nature 220, S. 239-241, 1968.
- 97) TERRY, W.D., SMALL, P.A. jr. und R.A. REISFELD: Electrophoretic heterogeneity of the polypeptide chains of human G-myelom proteins. Science 152, S. 1628-1630, 1966.
- 98) TISELLIUS, A. und E.A. KABAT: Electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. J. exp. Med. 69, S. 119-131, 1939.
- 99) TITANI, K., WHITLEY, E. jr., AVOGARDO, L. und F.W. PUTNAM: Immunoglobulin structure: partial amino acid sequence of a Bence-Jones protein. Science 149, S. 1090-1092, 1965.
- 100) TITANI, K., WHITLEY, E. jr. und F.W. PUTNAM: Immunoglobulin structure: Variation in the sequence of Bence-Jones protein. Science 152, S. 1513-1515, 1966.
- 101) VALENTINE, R.C.: Electron microscopy of Ig G immunoglobulins. Nobel Symp. 3, S. 252-258, 1967.
- 102) VALENTINE, R.C. und N.M. GREEN: Electron microscopy of an antibody-hapten complex. J.molec. Biol. 27, S. 615-617, 1967.
- 103) VALMET, E.: Demonstration of the microheterogeneity of human serum gamma-globulin by isoelectric focusing. Science Tools 15, S. 8-11, 1968.
- 104) VESTERBERG, O.: General aspects of isoelectric focusing of proteins. Prot. biol. Fluids 17th Coll., S. 383-387, 1970.
- 105) VESTERBERG, O. und H. SVENSSON: Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. Acta chem. Scand. 20, S. 820-834, 1966.

- 106) WANG, A.C., WILSON, S.K., HOPPER, J.E., FUDENBERG, H.H. und A. NISONOFF: Evidence for control of the variable regions of the heavy chains of immunoglobulins G and M by the same gene. Proc. nat. Acad. Sci. USA 66, S.337-343, 1970.
- 107) WARBURG, O. und W. CHRISTIAN: Isolierung und Kristallisierung des Gärungsfermentes Enolase. Biochem. Z. 310, S. 384-421, 1941.
- 108) WEBER, K. und M. OSBORN: The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. J. biol. Chem. 244, S. 4406-4412, 1969.
- 109) WIKLER, M., KÜHLER, H., SHINODA, T. und F.W. PUTNAM: Macroglobulin structure: homology of mu and gamma heavy chains of human immunoglobulins. Science 163, S. 75-78, 1969.
- 110) Wissenschaftliche Tabellen Geigy, 7. Aufl., Basel 1968.
- 111) WRIGLEY, C.W.: Analytical fractionation of plant and animal proteins by gel electrofocusing. J. Chrom. 36, S. 362-365, 1968.
- 112) WRIGLEY, C.W.: Gel electrofocusing - a technique for analyzing multiple protein samples by isoelectric focusing. Science Tools 15, S. 19-23, 1968.

Lebenslauf

Am 5. Oktober 1945 wurde ich als Sohn von Eleonora Schmidt, geb. Pöschl, und Josef Schmidt in Weißkirchlitz, Kreis Teplitz-Schönau, in Böhmen geboren.

Nach unserer Aussiedlung im Frühjahr 1946 lebte unsere Familie zunächst in Oberhessen. Ab 1952 besuchte ich in Rüsselsheim, Kreis Groß-Gerau, Groß-Gerau und wieder Rüsselsheim die Volksschule und ab 1956 ein neusprachliches Gymnasium. Am 9. Februar 1965 legte ich an der Max-Planck-Schule in Rüsselsheim die Reifeprüfung ab.

Zum Sommersemester 1965 wurde ich für das Medizinstudium an der Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz zugelassen. Hier studierte ich elf Semester lang und bestand am 1. April 1966 die naturwissenschaftliche, am 3. Oktober 1967 die ärztliche Vorprüfung und am 10. Dezember 1970 die Ärztliche Prüfung jeweils mit dem Gesamturteil "sehr gut".

Meine Medizinalassistentenzeit begann ich am 1. März 1971 an der II. Medizinischen Universitätsklinik in Mainz und arbeitete hier bis Dezember 1971. Vom 15. Januar bis 17. Mai 1972 leistete ich meine chirurgische Pflichtzeit am St. Vincenz- und Elisabeth-Hospital in Mainz ab.

Daraufhin erhielt ich am 14. Juni 1972 meine Approbation als Arzt.

Die Zeit bis Ende September 1972 diente zur endgültigen Fertigstellung der vorliegenden Doktorarbeit.

Am 1. Oktober 1972 habe ich meine Weiterbildungszeit auf dem Fachgebiet der Inneren Medizin begonnen und zunächst bis 31. Dezember 1973 an der Inneren Abteilung des St. Josef-Hospitals in Bochum bei Herrn Prof. Dr. med. D. Ricken gearbeitet.

Seit dem 1. Januar 1974 bin ich als wissenschaftlicher Assistent bei Herrn Prof. Dr. med. H. Ditschuneit an der Abteilung für Stoffwechsel und Ernährung des Zentrums für Innere Medizin und Kinderheilkunde der Universität Ulm tätig.

